

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-500233

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)1月13日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/13	Z N A		
A 0 1 K 67/027		9123-2B	
A 6 1 K 39/395	V	9284-4C	
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00
		9281-4B	5/ 00
			A
			B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願平3-515142	(71)出願人	ジェンファーム インターナショナル, インコーポレイティド
(86) (22)出願日	平成3年(1991)8月28日		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94043, マウンテン ビュー, ガルシア アベニュー 2375
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)2月26日	(72)発明者	ロンバーク, ニルス
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 1 / 0 6 1 8 5		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94111, サンフランシスコ, #1202, バッテリー ストリート 550
(87)国際公開番号	W O 9 2 / 0 3 9 1 8	(74)代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)
(87)国際公開日	平成4年(1992)3月19日		
(31)優先権主張番号	5 7 4, 7 4 8		
(32)優先日	1990年8月29日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(31)優先権主張番号	5 7 5, 9 6 2		
(32)優先日	1990年8月31日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 異種抗体を産出することができるトランスジェニック非ヒト動物

(57)【要約】

本発明は、異種抗体、即ち非ヒト動物の種のゲノム中に通常は見つからない免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子によりコードされる抗体、を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物に関する。本発明の一観点では、再配列されていない異種ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖をコードするトランスジェンを非ヒト動物中に導入し、それによってヒト免疫グロブリン遺伝子によりコードされる抗体を産生することのできるトランスジェニック動物を形成せしめる。そのような異種ヒト抗体はB細胞中で産生され、該B細胞は、その後、例えば、不死化細胞系例えばミエローマとの融合によりまたは異種モノクローナル抗体を産生することのできる細胞系を不滅にする他の技術によってB細胞を処理することにより、不死化される。本発明は、そのようなトランスジェニック非ヒト動物を製造するための重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェン、並びにトランスジェニック非ヒト動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子座を破壊するための方法およびベクターにも関する。本発明は、トランスジェンの作製において使われる合成免疫グロブリ

ン可変領域伝子の調製方法、および再配列されたまたは再配列されていない異種軽鎖および重鎖免疫グロブリントランスジェンを含有する動物を使って異種抗体産生を誘導する方法も包含する。

請求の範囲

1. 少なくとも1つの可変領域セグメント、1つの多様性遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る単離された免疫グロブリン重鎖トランスジェンであって、前記遺伝子セグメントの各々が同一種からまたは前記種の個体からの免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントに相当するDNAから誘導され、そして該セグメントが生体内で遺伝子再配列を受けて重鎖ポリペプチドをコードする再配列された遺伝子を形成することができることを特徴とする、前記免疫グロブリン重鎖トランスジェン。

2. 前記トランスジェンの長さが、前記重鎖トランスジェン上に含まれる遺伝子セグメントの全部を含む対応するゲノムDNAの長さよりも短い、請求項1の免疫グロブリン重鎖トランスジェン。

3. 前記少なくとも1つの定常領域遺伝子セグメントが少なくとも2つの定常領域遺伝子セグメントを含んで成る、請求項1のトランスジェン。

4. 前記1つの定常領域遺伝子セグメントが μ および γ 定常領域遺伝子セグメントを含んで成る、請求項3のトランスジェン。

5. 前記少なくとも1つの定常領域遺伝子セグメントが γ 定常領域遺伝子セグメントを含んで成る、請求項1のトランスジェン。

6. 前記少なくとも1つの可変遺伝子セグメントが、前記種または前記種の第一の機能的D近位可変領域遺伝子セグメントに相当するDNAを含んで成る、請求項1のトランスジェン。

7. 前記遺伝子セグメントの各々の相対位置が前記種のゲノム中の対応する遺伝子セグメントの相対位置と同じである、請求項1のトランスジェン。

nsジェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物。

17. 前記重鎖および前記軽鎖トランスジェンが再配列されている、請求項16のトランスジェニック非ヒト動物。

18. 前記重鎖および前記軽鎖トランスジェンが再配列されていない、請求項16のトランスジェニック非ヒト動物。

19. 前記重鎖トランスジェンと前記軽鎖トランスジェンのうちの一方が再配列されており、そして前記重鎖トランスジェンと前記軽鎖トランスジェンのうちの他方が再配列されていない、請求項16のトランスジェニック非ヒト動物。

20. 前記重鎖トランスジェンが再配列されておらずそして前記軽鎖トランスジェンが再配列されている、請求項19のトランスジェニック非ヒト動物。

21. 前記トランスジェンが前記動物のB細胞中で機能的に再配列される、請求項16のトランスジェニック非ヒト動物。

22. 前記B細胞が異種抗体を産生する、請求項21のトランスジェニック非ヒト動物。

23. 前記異種重鎖および軽鎖遺伝子がヒトである、請求項16のトランスジェニック非ヒト動物。

24. 前記非ヒト動物が齧歯類である、請求項16のトランスジェニック非ヒト動物。

25. 免疫グロブリン重鎖トランスジェンおよび免疫グロブリン軽鎖トランスジェンを含有する非ヒト動物の少なくとも1つの細胞において異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物であって、前記重鎖トランスジェンは少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの多様性遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成り、そして前記免疫グロブリン軽鎖トランスジェン

8. 前記種がヒトである、請求項1のトランスジェン。

9. 前記トランスジェンが再配列されておらず、そして非ヒトトランスジェニック動物のB細胞中に導入されると再配列を受けてV領域多様性を生じることができる、請求項1のトランスジェン。

10. 少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る単離された免疫グロブリン軽鎖トランスジェンであって、前記遺伝子セグメントの各々が同一種からまたは前記種の個体からの免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメントに相当するゲノムDNAから誘導され、そして該セグメントが生体内で遺伝子再配列を受けて軽鎖ポリペプチドをコードする再配列された遺伝子を形成することができることを特徴とする、前記免疫グロブリン軽鎖トランスジェン。

11. 前記トランスジェンの長さが、前記軽鎖トランスジェン上に含まれる遺伝子セグメントの全部を含む対応するゲノムDNAの長さよりも短い、請求項9の免疫グロブリン軽鎖トランスジェン。

12. 前記少なくとも1つの可変領域遺伝子セグメントが、前記種または前記種の第一の機能的J近位可変遺伝子セグメントに相当するDNAを含んで成る、請求項11のトランスジェン。

13. 前記遺伝子セグメントの各々の相対位置が前記種または前記種のゲノム中の対応する遺伝子セグメントの相対位置と同じである、請求項11のトランスジェン。

14. 前記種または個体がヒトである、請求項9のトランスジェン。

15. 前記トランスジェンが再配列されておらず、そして非ヒトトランスジェニック動物のB細胞中に導入されると再配列を受けてV領域多様性を生じることができる、請求項10のトランスジェン。

16. 動物の生殖細胞中に異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トラ

は少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成り、ここで前記重鎖および軽鎖トランスジェンの前記遺伝子セグメントの各々は単離された形態であるか、または前記非ヒト動物から成らない種または前記種の個体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAに相当することを特徴とする、前記トランスジェニック非ヒト動物。

26. 前記トランスジェニック非ヒト動物が齧歯類である、請求項25のトランスジェニック動物。

27. 前記トランスジェンがヒト抗体遺伝子セグメントをコードする、請求項25のトランスジェニック非ヒト動物。

28. 前記トランスジェニック動物の少なくとも1つの内因性免疫グロブリン遺伝子座が機能的に破壊されている、請求項25のトランスジェニック非ヒト動物。

29. 前記内因性遺伝子座の破壊が、重鎖または軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントを破壊することによって生じ、前記遺伝子セグメントが多様性、連結および定常遺伝子セグメントから成る群から選ばれる、請求項28のトランスジェニック非ヒト動物。

30. 前記内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントが、前記重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする連結領域遺伝子セグメントである、請求項29のトランスジェニック非ヒト動物。

31. 前記破壊が前記選ばれた遺伝子セグメントの実質的部の欠失によるものである、請求項29のトランスジェニック非ヒト動物。

32. 前記重鎖トランスジェンと前記軽鎖トランスジェンが再配列されていない、請求項25のトランスジェニック非ヒト動物。

33. 前記重鎖トランスジェンと前記軽鎖トランスジェンが再配列

されている、請求項25のトランスジェニック非ヒト動物。

34. 前記重鎖トランスジェンと前記軽鎖トランスジェンのうちの一方が再配列されており、そして前記重鎖トランスジェンと前記軽鎖トランスジェンのうちの他方が再配列されていない、請求項25のトランスジェニック非ヒト動物。

35. 前記重鎖トランスジェンが再配列されておらず、そして前記軽鎖トランスジェンが再配列されている、請求項34のトランスジェニック非ヒト動物。

36. トランスジェニック非ヒト動物から誘導された非ヒトB細胞であって、異種抗体を産生することができる非ヒトB細胞。

37. 前記B細胞が、機能的に再配列された異種重鎖免疫グロブリントランスジェンと機能的に再配列された異種軽鎖免疫グロブリンとを含有する、請求項36の非ヒトB細胞。

38. 前記機能的に再配列された重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンの各々がヒト起源のものである、請求項37の非ヒトB細胞。

39. 前記B細胞が同種抗体を産生しない、請求項36の非ヒトB細胞。

40. トランスジェニック非ヒト動物から誘導された非ヒトB細胞に融合したミエローマ細胞を含んで成るハイブリドーマであって、前記B細胞にとって異種であるモノクローナル抗体を産生することができる前記ハイブリドーマ。

41. 前記非ヒトB細胞から誘導された前記ハイブリドーマのゲノム物質が、機能的に再配列された重鎖免疫グロブリントランスジェンと機能的に再配列された軽鎖免疫グロブリントランスジェンとを含有し、前記機能的に再配列されたトランスジェンの各々が前記B細胞にとって異種である、請求項40のハイブリドーマ。

る、請求項46の方法。

51. 前記機能的破壊が定常領域遺伝子セグメントの破壊である、請求項46の方法。

52. 前記遺伝子セグメントが、 μ 重鎖定常領域遺伝子セグメント、 κ 軽鎖定常領域遺伝子セグメントおよび機能的 λ 軽鎖定常領域遺伝子セグメント群から成る群から選ばれることを特徴とする、請求項51の方法。

53. 少なくとも1つの再配列された異種免疫グロブリン重鎖トランスジェンと少なくとも1つの再配列された異種免疫グロブリン軽鎖トランスジェンとを含有する少なくとも1つのB細胞を有するトランスジェニック非ヒト動物中での異種抗体の産生方法であって、ここで前記抗体は抗原を結合することができ、

前記トランスジェニック動物を前記抗原と接触させて前記異種抗体の産生を誘導する段階を含んで成る方法。

54. 前記接触が前記トランスジェンの少なくとも1つの体細胞突然変異を引き起こす、請求項53の方法。

55. 前記異種抗体を産生するB細胞の少なくとも1つを不活化して前記異種抗体に相当するモノクローナル抗体の原を提供する段階を更に含んで成る、請求項53の方法。

56. 前記不活化がハイブリドーマを形成させるための前記B細胞とミエローマ細胞との融合による、請求項55の方法。

57. 請求項55の方法に従って産生されるモノクローナル抗体。

58. 前記重鎖および軽鎖トランスジェンがヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを含んで成り、そして前記抗体がヒト抗体である、請求項57の方法。

59. 少なくとも1つの再配列された異種免疫グロブリン重鎖トランスジェンと少なくとも1つの再配列された異種免疫グロブリン軽

鎖トランスジェンがヒト起源のものである、請求項41のハイブリドーマ。

43. 前記モノクローナル抗体がヒト抗体である、請求項40のハイブリドーマ。

44. 前記B細胞が腫瘍系起源のものである、請求項40のハイブリドーマ。

45. 前記ミエローマ細胞がマウス起源のものである、請求項40のハイブリドーマ。

46. 非ヒト動物の少なくとも1つの内因性免疫グロブリン遺伝子座が機能的に破壊されているトランスジェニック非ヒト動物の製造方法であって、

非ヒト動物の少なくとも1つの胎児性幹細胞を、内因性重鎖または軽鎖免疫グロブリンをコードする遺伝子セグメントのファミリーの機能的破壊を標的とするトランスジェンと接触せしめ、ここで前記遺伝子セグメントのファミリーは、機能的な内因性の多様性、連結および定常遺伝子セグメントファミリーから成る群から選ばれ；そして

前記トランスジェンが相同組換えにより前記非ヒト動物のゲノム中に組み込まれている少なくとも1つの胎児性幹細胞を選択する、段階を含んで成る方法。

47. 前記トランスジェンがポジティブ・ネガティブ選別ベクターを含んで成る、請求項46の方法。

48. 前記機能的破壊が前記遺伝子セグメントファミリーの全部または一部の欠失を含んで成る、請求項46の方法。

49. 前記欠失が連結遺伝子セグメントのファミリーの欠失である、請求項48の方法。

50. 前記機能的破壊が転写または翻訳終結配列の導入を含んで成

るトランスジェンとを含有する少なくとも1つのB細胞を有するトランスジェニック非ヒト動物中での第一異種抗体の産生方法であって、ここで前記第一異種抗体は第一抗原を結合することができ、そして前記重鎖および軽鎖トランスジェンは既知の第二抗原に反応して体細胞突然変異を受けて第二異種抗体を産生することができ、前記方法が、次の段階：

前記トランスジェニック動物を少なくとも前記第一抗原と接触せしめて前記重鎖または軽鎖トランスジェンの少なくとも1つの体細胞突然変異を誘導し、前記第一異種抗体を産生することのできるB細胞を生産する

を含んで成ることを特徴とする方法。

60. 前記接触が、前記第一抗原と前記第二既知抗原とを連続または同時接触せしめて前記第一および前記第二異種抗体をそれぞれ産生することのできる第一および第二B細胞を生産することを含んで成る、請求項59の方法。

61. 前記第一異種抗体を産生する前記B細胞の少なくとも1つを不活化して前記第一異種抗体に相当するモノクローナル抗体の原を提供する段階を更に含んで成る、請求項59の方法。

62. 前記不活化がハイブリドーマを形成させるための前記B細胞とミエローマ細胞との融合による、請求項61の方法。

63. 請求項61の方法に従って産生されるモノクローナル抗体。

64. 前記再配列された重鎖および軽鎖トランスジェンがヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを含んで成り、そして前記抗体がヒト抗体である、請求項63の方法。

65. 合成免疫グロブリンVセグメントレパートリーの作製方法であって、次の段階：

(a)免疫グロブリンVセグメントDNAの集団を作製し、ここで前

配VセグメントDNAの各々は免疫グロブリンVセグメントをコードしそして第一制限エンドヌクレアーゼの第一開裂認識部位を各末端に含有しており；そして

(b) 前記免疫グロブリンVセグメントDNAの集団を鎖状に連結して合成免疫グロブリンVセグメントレパートリーを形成せしめるを含んで成る方法。

66. 前記VセグメントDNAの集団がゲノムDNAから誘導され、そして前記作製がP1およびP2プライマーを使ったPCR増幅によるものであり、ここで前記P1プライマーは、5'から3'方向において、前記開裂認識部位および前記ゲノムDNA中の多数の免疫グロブリンVセグメントのC末端部分の一方の鎖にハイブリダイズすることのできる配列をコードするプライマーの混合物を含んで成り、そして前記P2プライマーは、5'から3'方向において、前記開裂認識部位および前記ゲノムDNA中の前記多数の免疫グロブリンVセグメントのN末端部分の相補鎖にハイブリダイズすることのできる配列をコードするプライマーの混合物を含んで成る、請求項65の方法。

67. 前記免疫グロブリンVセグメントDNAの集団がB細胞mRNAから誘導され、そして前記作製が次の段階：

(i) 5'から3'方向において、前記開裂認識部位および前記mRNAが転写されるゲノムDNA中の多数の免疫グロブリンVセグメントのC末端部分のコード鎖にハイブリダイズすることのできる配列をコードするプライマーの混合物を含んで成るプライマーP1を用いて、前記mRNAからの一本鎖cDNAの合成を開始し；

(ii) 5'から3'方向において、前記開裂認識部位および前記ゲノムDNA中の前記多数の免疫グロブリンVセグメントのN末端部分のアンチセンス鎖にハイブリダイズすることのできる配列をコードするプライマーの混合物を含んで成るプライマーP2を用いて、前記

請求項71の方法。

73. 請求項65の方法に従って作製される合成Vセグメントレパートリー。

74. 発現可能なVセグメントの調製方法であって、次の段階：

(a) Vセグメントの第二エクソンをコードし且つその各末端に第一制限エンドヌクレアーゼの第一開裂認識部位を含有する少なくとも1つのVセグメントDNAを作製し；そして

(b) 前記VセグメントDNAを発現ベクター中に連結せしめ、ここで前記発現ベクターは、免疫グロブリンプロモーター、免疫グロブリン分泌シグナル配列、前記ベクターを第二制限エンドヌクレアーゼで開裂させると前記VセグメントDNAを連結することができる第二制限エンドヌクレアーゼの第二開裂認識部位および組換え配列を順に含んで成る

を含んで成る方法。

75. 複数のDNA断片から形成される免疫グロブリン(Ig)重鎖小遺伝子座トランスジェン構成物であって、該構成物はヒトIgタンパク質のヒト可変(V)領域、多様性(D)領域、連結(J)領域および定常(C)領域をコードするDNA配列を含んで成り、前記配列は転写調節配列に作用可能に連結されておりそして生体内で遺伝子再配列を受けるとヒト重鎖ポリペプチドをコードする再配列された遺伝子を生じることができ、ここで該DNA断片の少なくとも3つの各々が

- V領域配列、
- D領域配列、
- Jおよび定常領域配列、
- DおよびJおよび定常領域配列、または
- 1つの定常領域配列

一本鎖cDNAから二本鎖cDNAの合成を開始する

を含んで成る、請求項65の方法。

68. 前記免疫グロブリンVセグメントDNAの各々が、前記VセグメントDNAの一方の末端に第一の開裂認識部位を含有しそして前記VセグメントDNAの他方の末端に第二の異なる開裂認識部位を含有し、そして前記方法が前記二本鎖cDNAをP3およびP4プライマーを用いて増幅せしめる段階を更に含んで成り、ここで前記P3プライマーは前記第一の開裂認識部位をコードするDNAを含んで成り、そして前記P4プライマーは前記第二の開裂認識部位をコードするDNAを含んで成る、請求項67の方法。

69. 前記免疫グロブリンVセグメントが、第一のシグナル配列エクソンおよびゲノムDNAによりコードされる複数の免疫グロブリンVセグメントの第二エクソンをコードするDNAを含んで成る、請求項65の方法。

70. 前記免疫グロブリンVセグメントDNAの集団が、ゲノムDNAによりコードされる複数の免疫グロブリンVセグメントの第二エクソンをコードするDNAを含んで成る、請求項65の方法。

71. 前記集団の各メンバーを発現ベクター中に連結せしめることにより、第二制限エンドヌクレアーゼの第二開裂部位、免疫グロブリンプロモーター、免疫グロブリン分泌シグナル配列、第三制限エンドヌクレアーゼの第三開裂認識部位、組換えシグナル配列および第四制限エンドヌクレアーゼの第四開裂認識部位を順に含んで成る発現カセットを形成せしめ、前記連結は前記第三開裂認識部位中であって前記第二開裂認識部位と前記第四開裂認識部位との間に前記発現カセットを形成する、請求項70の方法。

72. 前記連結が、前記発現ベクターを前記第二および第四制限エンドヌクレアーゼで消化することによる発現カセットの連結である、

を含んで成り、

前記Igタンパク質コード配列の全部がヒト遺伝子配列と実質的に相同である、前記小遺伝子座トランスジェン構成物。

76. 前記小遺伝子座トランスジェン構成物が長さ約75 kbである、請求項75の小遺伝子座トランスジェン構成物。

77. 前記定常領域遺伝子配列が2つの異なる免疫グロブリンイソタイプをコードする、請求項75の小遺伝子座トランスジェン構成物。

78. 前記定常領域遺伝子配列がスイッチ組換えを受けることができる、請求項77の小遺伝子座トランスジェン構成物。

79. 前記イソタイプが μ および γ である、請求項77の小遺伝子座トランスジェン構成物。

80. 前記定常領域遺伝子配列が重鎖 γ イソタイプをコードする、請求項75の小遺伝子座トランスジェン構成物。

81. 前記Igコード配列が単一遺伝子からのものである、請求項75の小遺伝子座トランスジェン構成物。

82. 前記定常領域配列が第二定常領域の5'に μ 定常領域を含んで成る、請求項75のIg小遺伝子座トランスジェン構成物。

83. 前記構成物が、 μ 定常領域の5'にスイッチ供と体領域、および μ 定常領域と第二定常領域との間にスイッチ受容体領域を更に含んで成り、前記スイッチ領域が生体内でスイッチングを行うために作用可能に連結されている、請求項82のIg小遺伝子座トランスジェン構成物。

84. 前記スイッチ供と体領域がヒト μ スイッチ領域である、請求項83のIg小遺伝子座トランスジェン構成物。

85. 前記スイッチ受容体領域がヒト γ スイッチ領域である、請求項83のIg小遺伝子座トランスジェン構成物。

86. 前記第二定常領域が γ 定常領域である、請求項83のIg小遺

伝子座トランスジェン構成物。

87. 複数のDNA断片から形成される免疫グロブリン(Ig)軽鎖小遺伝子座トランスジェン構成物であって、該構成物はヒトIgタンパク質のヒト可変(V)領域、連結(J)領域および定常(C)領域をコードするDNA配列を含んで成り、前記配列は転写調節配列に作用可能に連結されておりそして生体内で遺伝子再配列を受けるとヒト軽鎖ポリペプチドをコードする再配列された遺伝子を生じることができ、ここで該DNA断片の少なくとも3つの各々が

V領域配列、

Jおよび定常領域配列、または

定常領域配列

を含んで成り、

前記Igタンパク質コード配列の全部がヒト遺伝子配列と実質的に相同である、前記小遺伝子座トランスジェン構成物。

88. 前記遺伝子配列が単一遺伝子からのものである、請求項87の小遺伝子座トランスジェン構成物。

89. 前記小遺伝子座トランスジェン構成物が約50 kb から成る、請求項87の小遺伝子座トランスジェン構成物。

90. 前記1つの可変遺伝子が連結遺伝子配列に作用可能に連結されている、請求項87の小遺伝子座トランスジェン構成物。

91. 前記各領域の相対位置が生産細胞軽鎖遺伝子中の対応領域の相対位置と同じである、請求項87の小遺伝子座トランスジェン構成物。

92. 免疫グロブリン遺伝子挿入断片を含有する酵母人工染色体(YAC)であって、前記挿入断片は、生体内で再配列を受けて再配列された遺伝子を形成することができる免疫グロブリン可変遺伝子配列、連結遺伝子配列および定常領域配列を含んで成り、ここで前記

中に導入し、それによって前記ヌクレオチド断片が相同組換えによってゲノム中に組み込まれることにより前記内因性遺伝子を破壊することを含んで成る方法。

103. 前記DNA断片を前記ゲノム中に導入する段階が、胎児性幹細胞の形質転換によって行われる、請求項102の方法。

104. 前記破壊が連結遺伝子セグメントの欠失を含んで成る、請求項102の方法。

105. 前記破壊がエンハンサーのまたは κ 定常領域の欠失を含んで成る、請求項102の方法。

106. 請求項102の方法により製造される非ヒト哺乳動物。

107. V領域配列がVH251を含んで成る、請求項75または87の単離された免疫グロブリン軽鎖小遺伝子座トランスジェン構成物。

108. 再配列されたヒト免疫グロブリンを産生することができ且つ異種ヌクレオチド配列挿入断片を含む内因性免疫グロブリン遺伝子を有することができるトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

109. 前記異種ヌクレオチド配列が内因性免疫グロブリンポリペプチドの発現を減少させる、請求項108の哺乳動物。

110. 前記異種ヌクレオチド配列が内因性 μ 重鎖ポリペプチドの発現を減少させる、請求項108の哺乳動物。

111. 前記異種ヌクレオチド配列が内因性軽鎖ポリペプチドの発現を減少させる、請求項108の哺乳動物。

112. 前記軽鎖ポリペプチドが κ または λ である、請求項111の哺乳動物。

113. 前記異種ヌクレオチド配列が転写または翻訳終結配列を導入する、請求項108の哺乳動物。

114. 前記哺乳動物がマウスである、請求項108の哺乳動物。

115. 前記免疫グロブリンが、可変遺伝子セグメント、連結遺伝

子座トランスジェン構成物をコードする、前記YAC。

93. 前記染色体が多量性遺伝子配列を更に含んで成る、請求項92のYAC。

94. 前記染色体が、生体内でイソタイプスイッチングを受けるように作用可能に連結されているスイッチ供与体領域およびスイッチ受容体領域を更に含んで成る、請求項92のYAC。

95. 前記遺伝子配列が同一個体からのものである、請求項92のYAC。

96. 前記挿入断片が約85 kb である、請求項92のYAC。

97. 前記挿入断片に作用可能に連結された転写調節配列を更に含んで成る、請求項92のYAC。

98. トランスジェニック非ヒト動物中での変更ゲノムの作製方法であって、

重複配列を有する2つの酵母人工染色体を融合し、ここで前記染色体は一路になって複合的免疫グロブリン遺伝子座をコードし；そして

酵母人工染色体を哺乳動物のゲノム中に挿入することを含んで成る方法。

99. 前記酵母人工染色体がポリアミンを用いて融合される、請求項98の方法。

100. 前記挿入段階がトランスフェクションまたはリポフェクションにより行われる、請求項98の方法。

101. 前記酵母人工染色体がゲノム中に組み込まれる、請求項98の方法。

102. 非ヒト哺乳動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子を不活性化する方法であって、前記内因性免疫グロブリン遺伝子に相同であるヌクレオチド配列を含んで成るDNA断片を前記哺乳動物のゲノム

子セグメントおよび定常領域遺伝子セグメントを有する免疫グロブリン小遺伝子座トランスジェン構成物から発現される、請求項108の哺乳動物。

116. 前記小遺伝子座トランスジェン構成物が重鎖遺伝子である、請求項115の哺乳動物。

117. 再配列された免疫グロブリントランスジェン構成物を含んで成る、請求項108の哺乳動物。

118. 前記再配列されたトランスジェン構成物が κ 軽鎖をコードする、請求項117の哺乳動物。

119. 前記再配列されたトランスジェン構成物が重鎖をコードする、請求項117の哺乳動物。

120. トランスジェニック非ヒト哺乳動物から免疫グロブリンを産生せしめる方法であって、ここで前記哺乳動物は特定の抗原を認識する再配列された免疫グロブリントランスジェン構成物を有し、

トランスジェニック哺乳動物を前記特定の抗原で免疫処置し；そして

前記特定の抗原を結合する免疫グロブリンを産生するトランスジェニック哺乳動物からのB細胞についてスクリーニングすることを含んで成る方法。

121. スクリーニングの段階が前記トランスジェニック哺乳動物から単離されたB細胞を不死化することを含む、請求項120の方法。

122. 請求項121の方法に従って製造された不死化された細胞であって、選択されたB細胞をミエロマ細胞と融合することによって形成されたハイブリドーマである前記細胞。

123. 請求項120のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体。

124. 次の段階：

スクリーニング段階前にトランスジェニック動物を第二抗原で免疫処置し；そして

前記第二抗原を結合する免疫グロブリンを産生するB細胞についてスクリーニングする

を更に含んで成る、請求項120の方法。

125. 前記抗原のうちの1つがヒト免疫グロブリンである、請求項120の方法。

126. 前記マウスがT細胞レセプタートランスジェンを含んで成り、そして前記抗原のうちの1つがヒトT細胞レセプターである、請求項120の方法。

127. トランスジェニックマウスであって、

(i) 可変遺伝子配列、多様性遺伝子配列、連結遺伝子配列、並びにスイッチ供与体配列およびスイッチ受容体配列に作用可能に連結された2つの定常領域配列を含んで成る重鎖ヒトトランスジェン；

(ii) 可変遺伝子配列、連結遺伝子配列および定常遺伝子配列を含んで成る軽鎖トランスジェン；および

(iii) 各トランスジェンに作用可能に連結された転写調節配列を含んで成るゲノムを有し、ここで前記遺伝子配列および調節配列は生体内において発生的に制御される多様性の発現を行って複数のヒト免疫グロブリンを形成する、前記トランスジェニックマウス。

128. 血清1mlあたり約1μgのヒト免疫グロブリンを産生する、請求項127のトランスジェニックマウス。

129. ヒト免疫グロブリンの約10%より多くがIgGである、請求項127のトランスジェニックマウス。

130. ヒト免疫グロブリンが予め選択された抗原に対して約 10^{-7} M $^{-1}$ より大きい親和性を示す、請求項127のトランスジェニックマウス。

140. リンパ系細胞サブセットと特異的に反応するヒト免疫グロブリン。

141. 前記サブセットがヒトT細胞サブセットである、請求項140のヒト免疫グロブリン。

142. 前記サブセットが自己反応性T細胞である、請求項141のヒト免疫グロブリン。

143. 免疫グロブリンDNA断片のクローニングにおいて有用なプラスミドベクターであって、

(i) 複製開始点；

(ii) コピー調節配列；

(iii) 稀少な制限酵素部位により隣接されたクローニング部位；

(iv) プラスミド由来のプロモーターの上流で且つクローニング部位の下流に置かれ、それによってプロモーターのところで始まる転写がクローニング部位の上流で終結する、転写ターミネーターを含んで成るベクター。

144. 前記稀少な制限酵素部位が Not I, Sfi I および Pac I から選ばれる、請求項143に記載のベクター。

145. pGP1b, pGP1c, pGP1d, pGP1f および pGPe から成る群から選ばれる、請求項143に記載のベクター。

146. 請求項16, 25, 108, 127または137のトランスジェニックマウス内で発達したB細胞から単離された、再配列されたヒトVDJ遺伝子断片から本質的に成る組成物。

147. トランスジェニック齧歯類からのヒト免疫グロブリンの産生方法であって、前記齧歯類はヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンの生殖細胞型コピーを含んで成るゲノムを有し、前記齧歯類を抗原で免疫処置し；そして

前記抗原を結合する免疫グロブリンを産生する齧歯類からのB細胞

131. 外来抗原に対して免疫処置されると免疫応答を開始し、前記免疫応答が、該抗原により免疫処置された非トランスジェニックマウスの内因性免疫グロブリンにより結合される抗原の少なくとも約10%に結合することができるヒト免疫グロブリンを産生することを含んで成る、請求項127のトランスジェニックマウス。

132. 約1000種より多い異なるヒト免疫グロブリンを産生することができる、請求項131のトランスジェニックマウス。

133. 約1000種より多い異なるヒトIgG免疫グロブリンを産生することができる、請求項131のトランスジェニックマウス。

134. ヒト免疫グロブリンの産生方法であって、抗原により免疫処置された請求項131のトランスジェニックマウスからのB細胞を不死化し；そして前記抗原と反応性の免疫グロブリンを分泌する選択された不死化B細胞を増殖させることを含んで成る方法。

135. 請求項134に従って産生されるヒト免疫グロブリン(Ig)であって、ヒト免疫グロブリンと生来会合しているヒトタンパク質に関して単離されている前記ヒト免疫グロブリン。

136. 10^{-7} M $^{-1}$ より大きい抗原親和性を有する、請求項135のヒト免疫グロブリン。

137. ヒト免疫グロブリン重鎖小遺伝子座トランスジェンを含んで成るゲノムを有するトランスジェニックマウスであって、前記トランスジェンがマウス中で再配列およびスイッチすることができ、それによって2以上の再配列されたヒト重鎖イソタイプが生産されるトランスジェニックマウス。

138. 前記イソタイプがμおよびγである、請求項137のトランスジェニックマウス。

139. 請求項137のマウスにより産生される単離されたヒトモノクローナル抗体。

胞についてスクリーニングする

ことを含んで成る方法。

148. 前記軽鎖トランスジェンが生殖細胞において再配列される、請求項147の方法。

149. 前記重鎖トランスジェンが前記齧歯類の生殖細胞において再配列されない、請求項148の方法。

150. 請求項40, 53, 59, 120または147の方法に従って産生される単離されたヒト免疫グロブリン。

明 細 書

異種抗体を産生することができる
トランスジェニック非ヒト動物

技術分野

本発明は、異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物、そのようなトランスジェニック動物を産生するのに使うトランスジェン(transgene)、異種抗体を産生することのできる不活化B細胞、内因性免疫グロブリン遺伝子座を破壊するための方法およびベクター、合成免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントレパートリーの作製方法、並びに異種抗体産生を誘導する方法に関する。

発明の背景

ヒトにおけるモノクローナル抗体の生体内適用の開発に直面する主な障害の1つは、非ヒト免疫グロブリンの本質的免疫原性である。患者は傷害型免疫グロブリン配列に対して抗体を産生することにより傷害型モノクローナル抗体の治療用量に反応する。それらのヒト抗マウス抗体(HAMA)は治療抗体を中和し、急性毒性を引き起こし得る。HAMA反応は免疫不全患者ではあまり過激でない。従って、本質的免疫原性は、患者の免疫反応の一次的弱化を必要とする移植拒絶反応の治療への傷害型モノクローナル抗体の使用を妨害している。傷害型抗体は、免疫不全症を含む或る種のリンパ腫を治療するためにも有用なことがある。しかしながら、免疫不全患者でさえも、安全性や効能の低下を引き起こすHAMA反応を開始し得る。

モノクローナル抗体を作製するための現在の技術は、動物(通常

はラットまたはマウス)を抗原に予備暴露するか、または抗原で感作せしめることを伴う。この予備暴露は、抗原に対して高親和性を有する免疫グロブリン分子を分泌する脾性B細胞の形成をもたらす。感作動物の脾細胞を次いでミエロマ細胞と融合せしめ、不死の抗体分泌性ハイブリドマ細胞を形成せしめる。個々のハイブリドマクローンをスクリーニングして、特定抗原に対して向けられた免疫グロブリンを産生する細胞を同定する。

個々の抗体遺伝子の遺伝子工学は既に提案されている。2つの遺伝子工学アプローチが報告されている:キメラ抗体および相補性決定領域(CDR)移植。最も単純なアプローチであるキメラ抗体は、抗体分子の可変部分と定常部分が別々のエクソン上にコードされるという事実を利用する。再配列されたマウス抗体遺伝子の可変領域エクソンをヒト定常領域エクソンと単純に融合せしめることにより、ハイブリッド抗体遺伝子を得ることができる[Morrison, S.L.ら(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6851-6855]。このアプローチの主な問題点は、高度に免疫原性のマウスFc領域は排除されるけれども、残りのマウスFab配列がまだ免疫原性であることである[Bruggemannら(1989), *J. Exp. Med.*, **170**, 2153-2157]。CDR移植アプローチは、コンピューターモデルを使って完全に人工的な抗体を作製する。該抗体の中の唯一のマウス配列は抗原結合に関与するものである[Riechmann, L.ら(1988), *Nature*, **332**, 323-327]。それらの各アプローチは、着目の抗原に対して向けられた傷害型モノクローナル抗体の事前の特徴付けを必要とし、両者とも操作された抗体を高レベルで産生するトランスフェクトされた安定な細胞系の作製を必要とする。

ヒト抗体の産生のための別のアプローチは、免疫グロブリンcDNA配列を含む細菌発現ライブラリーの作製を伴う提案である[Orlandi

ら(1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3833-3837 および Huseら(1989), *Science*, **246**, 1275-1281]。この技術は、報告によれば、マウスcDNA配列由来の抗体断片を作製するためにのみ使われている。

多数の実験は、Ig遺伝子再配列に必要な特異的DNA配列を決定するためのトランスフェクトされた細胞系の使用を報告している[Lewis および Gellert (1989), *Cell*, **59**, 585-588]。そのような報告は推定上の配列を同定し、そして再配列に使う組換え酵素へのそれらの配列の近づきやすさ(accessibility)が転写により変更されると結論づけている[Yancopoulos および Alt (1985), *Cell*, **40**, 271-281]。V(D)J結合のための配列は、報告によれば、高度に保存されたほぼ回文式のヘプタマーと、12または23 bpのいずれかのスペーサーにより隔てられたあまり保存されていない高A/Tナノマーである[Tonegawa(1983), *Nature*, **302**, 575-581; Hesseら(1989), *Genes in Dev.*, **3**, 1053-1061]。効率的組換えは、伝えられるところによれば、異なる長さのスペーサー領域を有する組換えシグナル配列を含む部位の間でのみ起こる。

種々の形態の免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックマウスの製造も報告されている。再配列されたマウス免疫グロブリン重鎖または軽鎖遺伝子がトランスジェニックマウスの作製に使われている。そのようなトランスジェンは、報告によれば、内因性Ig遺伝子の再配列を排除することができる。例えばWeaverら(1985), *Cell*, **42**, 117-127; Iglesiasら(1987), *Nature*, **330**, 482-484; Storbら(1985), *Banbury Reports*, **20**, 197-207; Neubergerら(1989), *Nature*, **338**, 350-352; Hagmanら(1989), *J. Exp. Med.*, **169**, 1911-1929; 並びにStorbら(1989), *Immunoglobulin Genes*, Academic Press, T. Honjo, F.W. AltおよびT.H. Rabbitts 編。

303-326 頁を参照のこと。加えて、 μ または γ 1定常領域を含む機能的に再配列されたヒトIg遺伝子がトランスジェニックマウス中で発現されている。Yamamuraら(1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2152-2156; Nussenzweigら(1987), *Science*, **236**, 816-819を参照のこと。 μ 再配列重鎖遺伝子の場合、内因性免疫グロブリン遺伝子座の対立遺伝子排除が報告されている。

しかしながら、対立遺伝子排除は、全てのトランスジェニックB細胞において常に起こるものではない。例えばRathら(1989), *J. Immunol.*, **143**, 2074-2080(再配列された μ 遺伝子構成物); Manzら(1988), *J. Exp. Med.*, **168**, 1363-1381(経膜エクソンを欠く μ トランスジェンは内因性遺伝子の再配列を防止しなかった); Ritchieら(1984), *Nature*, **312**, 517-520; Storbら(1986), *J. Immunol. Rev.*, **89**, 85-102(安定な重鎖/軽鎖複合体を形成することのできる再配列された κ トランスジェンを発現するトランスジェニックマウスは、B細胞中で内因性 κ 遺伝子のみを再配列し、内因性重鎖遺伝子を正しく再配列することができない); およびManzら(1988), *J. Exp. Med.*, **168**, 1363-1381(重鎖と結合できない経膜をコードする κ 遺伝子を含むトランスジェニックマウスは、低レベルの対立遺伝子排除のみを示す)を参照のこと。Nussenzweigら(1988), *Nature*, **336**, 446-450; Durdikら(1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2346-2350; およびShimizuら(1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8020-8023も参照のこと。

高度免疫化トランスジェニックマウス中での15 kb マウス κ 遺伝子構成物(O'Brienら(1987), *Nature*, **326**, 405-409; Storb(1989), *Immunoglobulin Genes*, Academic Press, T. Honjo, F.W. Alt およびT.H. Rabbitts 編, 303-326 頁) および μ 重鎖トランスジェンの可変部分(Durdikら(1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

86, 2346-2350) における体細胞突然変異も報告されている。

Ig遺伝子再配列は、組織培養細胞において研究されているが、トランスジェニックマウスでは詳しく研究されていない。マウス中に導入された再配列試験構成物を記載している少数の報告が発表されているに過ぎない (Buchini ら(1987), *Nature*, 326, 409-411 (再配列されていないニワトリトランスジェン); Goodhart ら(1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4229-4233 (再配列されていないウサギ遺伝子); および Bruggemann ら(1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6709-6713 (ハイブリッドマウス-ヒト重鎖))。しかしながら、そのような実験の結果は説明的であり、場合によって、トランスジェンの不完全なまたは最小の再配列を生じることがある。

上記に基づくと、ヒト以外の種から誘導された異種モノクローナル抗体、例えばヒト起源の抗体に対する要求が存在することは明らかである。よって、モノクローナル抗体を調製する特定の種において療法的に利用することができるモノクローナル抗体の源を提供することが本発明の目的である。

上記目的に従って、異種抗体、例えばヒト抗体、を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物が提供される。

更に、異種抗体を発現することができるそのようなトランスジェニック動物からのB細胞であって、特定抗原に特異的なモノクローナル抗体の源を提供するために不活化されている前記B細胞を提供することが本発明の目的である。

この上記目的に従って、そのような異種モノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞を提供することが本発明の更なる目的である。

更にまた、上述の非ヒトトランスジェニック動物の製造に有用な

本発明のトランスジェンは、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る重鎖トランスジェンを包含する。免疫グロブリン軽鎖トランスジェンは、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。軽鎖および重鎖遺伝子セグメントをコードする遺伝子セグメントは、それらが誘導されるトランスジェニック非ヒト動物にとって異種であるか、またはトランスジェニック非ヒト動物から成らない種からの免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAに相当する。本発明の一観点によれば、個々の遺伝子セグメントが再配列されておらず、即ち機能的な免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードするには再配列されていないようなトランスジェンが作製される。そのような再配列されていないトランスジェンは、抗原に暴露すると、トランスジェニック非ヒト動物において該遺伝子セグメントの組換え(機能的再配列)および生成した再配列された免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖の体細胞突然変異を可能にする。

本発明の別の観点によれば、異種重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンは、再配列された異種DNAの比較的大きい断片を含んで成る。そのような断片は、典型的には異種免疫グロブリン遺伝子座からのC、J(および重鎖の場合にはD)セグメントの実質的部分を含む。加えて、そのような断片は可変遺伝子セグメントの実質的部分も含んで成る。

別の態様では、HP LaserJet Series IIHPLASE II, PR Segments である。そのようなトランスジェン構成物では、様々な調節配列、例えばプロモーター、エンハンサー、クラススイッチ領域、組換えシグナル等は、異種DNAから誘導された対応配列を含んで成る。ある

再配列されていないおよび再配列された異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンを提供することが本発明の目的である。

更にまた、トランスジェニック動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子鎖を破壊する方法を提供することが本発明の目的である。

更にまた、上述のトランスジェニック非ヒト動物において異種抗体産生を誘導する方法を提供することが本発明の目的である。

本発明の更なる目的は、本発明の1または複数のトランスジェンを作製するために使われる免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントレパートリーを作製する方法を提供することである。

上記の参考文献は、単に本出願の出願日より前のそれらの開示のために提供される。本発明者らが先行発明によってそのような開示より以前は権利がないと認めることと解釈してはならない。

発明の要約

上記目的に従って、本発明の一観点では、トランスジェニック動物の生殖細胞(ジャームライン)中に再配列された、再配列されていない、または再配列されたものと再配列されていないものとの組み合わせの、異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンを含有する、トランスジェニック非ヒト動物が提供される。

異種重鎖および/または軽鎖の再配列されていない免疫グロブリントランスジェンは、宿主非ヒト動物に導入されると、重鎖および軽鎖異種免疫グロブリン遺伝子鎖を含有するトランスジェニック非ヒト動物、または一方もしくは他方のトランスジェンを含有する中間動物を生ぜしめる。そのような中間動物の生殖細胞中に組み込まれると、重鎖トランスジェンを含むものと軽鎖トランスジェンとの間での交差が、重鎖と軽鎖の両方の異種免疫グロブリントランスジェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物をもたらす。

いは、そのような調節配列を、本発明に使われる非ヒト動物と同一のまたは関連の種からのトランスジェン中に組み込むことができる。例えば、トランスジェニックマウスに使うために、器官免疫グロブリンエンハンサー配列を有するトランスジェン中にヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを組み合わせることができる。

本発明の方法では、生殖細胞再配列されていない軽鎖および重鎖免疫グロブリントランスジェン—即ちD細胞分化中にVDJ結合を受けるもの—を抗原と接触せしめ、二次レパートリーB細胞における異種抗体の産生を誘導する。そのような誘導は、一次レパートリーB細胞中に含まれる再配列された重鎖および/または軽鎖トランスジェンにおいて体細胞突然変異を引き起こし、該抗原に対して高い親和性および特異性を有する異種抗体を産生する。

そのような抗体産生B細胞は、ウイルスを用いて、またはDNA構成物を含む癌遺伝子を用いて形質転換せしめることにより、あるいは、ミエローマ細胞系と融合させて抗体を分泌するハイブリドーマを形成せしめることにより、不活化することができる。各場合、特定抗原に対して十分な親和性および特異性を有するクローンを選択し、該トランスジェンの免疫グロブリン遺伝子セグメントが誘導される種において低い免疫原性を有するモノクローナル抗体源を提供する。

本発明に使われる非ヒト動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子座を破壊するベクターおよび方法も本発明に包含される。そのようなベクターおよび方法は、トランスジェン、好ましくはポジティブ-ネガティブ(positive-negative)選別ベクターを使用し、該ベクターは、それが本発明において使用する非ヒト動物にとって内因性である重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンをコードする遺伝子セグメントのクラスの機能的破壊を標的するように構成される。その

ような内因性遺伝子セグメントとしては、多様性領域、連結領域および定常領域遺伝子セグメントが挙げられる。本発明のこの観点によれば、ポジティブ・ネガティブ選別ベクターを少なくとも1つの非ヒト動物の胎児性幹細胞と接触させた後、ポジティブ・ネガティブ選別ベクターが相同組換えによって非ヒト動物のゲノム中に組み込まれている細胞を選択する。移植後、得られたトランスジェニック非ヒト動物は、該ベクターの相同組み込みの結果として、免疫グロブリン媒介の免疫応答を開始することが実質的に不可能である。そのような免疫不全非ヒト動物は、その後、免疫不全症の研究に使用ことができ、または異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンの受容体として使用することができる。

本発明はまた、本発明のトランスジェンに使用することができる合成可変領域遺伝子セグメントを作製する方法も包含する。該方法は、免疫グロブリンVセグメントDNAの集団を作製することを含んで成り、ここで各々のVセグメントDNAは免疫グロブリンVセグメントをコードしそして各末端に制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含む。その後、免疫グロブリンVセグメントDNAの集団を鎖状に連結して合成免疫グロブリンVセグメントレパートリーを形成せしめる。

本発明の別の観点は、トランスジェニック動物の生殖細胞中に機能的に再配列された異種重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物に関する。そのような動物は、上述の再配列された重鎖および軽鎖トランスジェンを発現する一次レパートリーB細胞を含有する。そのようなB細胞は、抗原と接触すると体細胞突然変異を受けて、該抗原に対して高い親和性および特異性を有する異種抗体を形成することができる。

本発明はまた、重鎖および軽鎖トランスジェンを有する生殖細胞

を含有するトランスジェニック動物であって、前記トランスジェン的一方が再配列された遺伝子セグメントを含み、他方が再配列されていない遺伝子セグメントを含む、トランスジェニック動物にも関する。

本発明は、再配列された重鎖および軽鎖異種免疫グロブリントランスジェンを有する一次レパートリーB細胞を含有するトランスジェニック動物中で異種抗体を産生せしめる方法にも関する。そのようなトランスジェニック動物は、上述したトランスジェニック動物のいずれかから得ることができる。該動物の生殖細胞中に再配列されない重鎖および軽鎖トランスジェンを含むトランスジェニック動物、再配列された重鎖および軽鎖トランスジェンを含有するトランスジェニック動物、または1つが再配列されたトランスジェンそしてもう1つが再配列されていないトランスジェンを含有する動物は、各々、再配列された異種重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンを有する一次レパートリーB細胞を含有する。本発明の方法では、第一抗原を結合することができる所望の異種第一抗体が産生される。そのような動物の一次レパートリーB細胞中の再配列された免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンは、第二の既知抗原に対して十分な親和性を有する一次レパートリー抗体を産生することが知られている。この方法では、トランスジェニック非ヒト動物を連続的にまたは同時に第一および第二抗原と接触せしめ、再配列されたトランスジェンの体細胞突然変異により第一異種抗体の産生を誘導する。次いでこうして産生された二次レパートリーB細胞を上述の如く操作して、第一抗原を結合することができる所望のモノクローナル抗体の産生を不死化する。

本発明は、複製開始点(ORI)、転写調節領域(例えばROP、またはpACYC177の転写調節配列、または当業界で既知の他の配列)およ

びクローニング部位を有する、大型のDNA断片(例えば免疫グロブリンゲノム断片)のクローニングに有用であるプラスミドにも関する。該プラスミドは更に、内因性プラスミド由来プロモーターの下流、例えばアンピシリン耐性遺伝子(amp^r)の下流に、転写ターミネーター(例えばtrp^rまたは当業界で既知の他の配列)も含む。転写ターミネーターは、プロモーターの所で始まる転写がクローニング部位の上流で終結するようにクローニング部位の上流に置かれる。好ましい態様では、クローニング部位は稀少な制限部位により隣接され、該制限部位は、より一般的な制限部位を作っている6以下のヌクレオチドの代わりに、7、8またはそれ以上のヌクレオチドから成る部位であり、例えばNot I、Sfi IおよびPac Iである。稀少な制限部位としては、天然のDNA配列中では稀に存在する、即ち8,000~10,000ヌクレオチド毎に約1回よりも低い頻度で存在するヌクレオチド配列を含む部位も挙げられる。

図面の簡単な説明

図1は、再配列されていないゲノムDNA中および再配列された免疫グロブリン重鎖遺伝子から発現されるmRNA中の相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3、並びにフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4を表す。

図2はヒトλ鎖遺伝子座を表す。

図3はヒトκ鎖遺伝子座を表す。

図4はヒト重鎖遺伝子座を表す。

図5および6は、合成Vセグメントレパートリーを作製するための方策を示す。

図7は、内因性免疫グロブリン遺伝子座の機能的破壊のための方策を示す。

図8は、B細胞の成熟を導くT細胞媒介二次応答を示す。

図9は、2つの異なる抗原に反応したB細胞の体細胞突然変異およびクローン増殖を示す。

図10は、ヒトγ3およびγ1定常領域を含む25 kb断片とその後のラット鎖3'エンハンサー配列を含む700 bp断片に連結された再配列されたIgM遺伝子を含有するトランスジェン構成物を示す。

図11は、生体内相同組換えによって軽鎖トランスジェンを形成するために使用することができる断片を表す、ヒトκ鎖遺伝子座の制限地図である。

図12はpGP1の作製を示す。

図13はpGP1に含まれるポリリンカーの構成を示す。

図14は、本発明のヒト重鎖トランスジェンを作製するのに使う断片を示す。

図15は、pHIG1およびpCON1の作製を示す。

図16は、pREG2を形成せしめるためにpRE3(ラットエンハンサー3')中に挿入されるヒトCγ1断片を示す。

図17はpHIG3'およびpCONの作製を示す。

図18は、本発明のトランスジェンの作製に使われるヒトD領域セグメントを含む断片を示す。

図19は、pHIG2(Dセグメント含有プラスミド)の作製を示す。

図20は、本発明のトランスジェンの作製に使われるヒトJκおよびヒトCκ遺伝子セグメントを包含する断片を示す。

図21はpEMの構造を示す。

図22はpKapHの作製を示す。

図23A~23Dは、マウスの内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選別ベクターの作製を示す。

図24A～24Cは、マウスの内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選択ベクターの作製を示す。

図25a～eは、 κ 鎖標的ベクターの構造を示す。

図26a～fは、マウス重鎖標的ベクターの構造を示す。

図27はベクター-pGPeの地図を示す。

図28はベクター-pJM2の構造を示す。

図29はベクター-pCOR1の構造を示す。

図30はpIGM1、pHC1およびpHC2のトランスジェン構成物を示す。

図31はp γ e2の構造を示す。

図32はpVGE1の構造を示す。

図33はpHC1トランスジェニックマウス中でのヒトIg発現のアクセス結果を示す。

図34はpJCK1の構造を示す。

図35は合成重鎖可変領域の作製を示す。

表1はベクター-pGPeの配列を示す。

表2は遺伝子V、49.8の配列を示す。

詳細な説明

異種抗体レパトリーによる外来抗原刺激に应答するトランスジェニック非ヒト動物のデザインは、トランスジェニック動物の内部に含まれた異種免疫グロブリントランスジェンがB細胞発達経路を通して正しく機能することを必要とする。従って、本発明の一観点では、下記の中の1つまたは全部をもたらすようにトランスジェンが作製される：(1)高レベルで且つ細胞型特異的な発現、(2)機能的な遺伝子再配列、(3)対立遺伝子排除の活性化およびそれに対する応答、(4)十分な一次レパトリーの発現、(5)シグナル形質導入、(6)ク

ばれる2つの領域を含んで成る。重鎖または軽鎖の定常領域は、重鎖または軽鎖定常領域遺伝子セグメントと呼ばれるゲノム配列によりコードされる。特定の重鎖遺伝子セグメントの使用が免疫グロブリンのクラスを限定する。例えば、ヒトでは、 μ 定常領域遺伝子セグメントが抗体のIgMクラスを限定し、一方で γ 1、 γ 2、 γ 3または γ 4定常領域遺伝子セグメントが抗体のIgGクラス並びにIgGのサブクラスIgG1～IgG4を限定する。

重鎖および軽鎖免疫グロブリンの可変領域は、一緒になって抗体の抗原結合領域を含む。広範囲の抗原を結合できるようにするために抗体のこの領域に多様性が必要なため、初期または一次レパトリー可変領域をコードするDNAは、特定の可変領域遺伝子セグメントのファミリーに由来する多数の異なるDNAセグメントを含んで成る。軽鎖可変領域の場合、そのようなファミリーは可変(V)遺伝子セグメントと連結(J)遺伝子セグメントを含んで成る。よって、軽鎖の初期可変領域は1つのV遺伝子セグメントと1つのJ遺伝子セグメントによってコードされ、各セグメントはその生物のゲノムDNA中に含まれるVおよびJ遺伝子セグメントのファミリーから選ばれる。重鎖可変領域の場合、重鎖の初期または一次レパトリー可変領域をコードするDNAは、1つの重鎖V遺伝子セグメント、1つの重鎖多様性(D)遺伝子セグメントおよび1つのJ遺伝子セグメントを含んで成り、各セグメントはゲノムDNA中の適当な免疫グロブリン遺伝子セグメントのV、DおよびJファミリーから選ばれる。

一次レパトリー

重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子をコードするDNAを作製する方法は、主としてB細胞を発達させることに存する。種々の免疫

ラススイッチ、(7)体細胞高度突然変異(hypermuation)、および(8)免疫応答の間のトランスジェン抗体遺伝子座の優性化。

下記開示から明らかなように、上記の基準の全てを満たす必要はない。例えば、トランスジェニック動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座が機能的に破壊されるそれらの懸念では、トランスジェンは対立遺伝子排除を活性化する必要がない。更に、トランスジェンが機能的に再配列された重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含んで成る懸念では、2番目の基準である機能的な遺伝子再配列は、少なくとも既に再配列されているトランスジェンには不要である。分子免疫学に関する背景については、Fundamental Immunology、第2版(1989)、Paul William E.編、Raven Press、N.Y.を参照のこと。

抗体の構造および産生

抗体としても知られている免疫グロブリンは、全ての哺乳類の血清および組織液中に存在する糖タンパク質の一群である。それらは、前駆体Bリンパ球(本明細書中で「一次レパトリーB細胞」とも呼称される)から発達する形質細胞(本明細書中で「二次レパトリーB細胞」とも呼称される)により多量に産生される。そのような一次レパトリーB細胞は、完全に分化した二次レパトリーB細胞によって産生されるものに類似している膜結合型免疫グロブリンを恒保持している。抗体形成の誘導には一次レパトリーB細胞と外来抗原との接触が必要である。

全ての免疫グロブリンの基本構造は、ジスルフィド結合によって一緒に連結された2つの同一の軽鎖ポリペプチドと2つの同一の重鎖ポリペプチドとから成る単位に基づく。各軽鎖は、可変軽鎖領域および定常軽鎖領域として知られる2つの領域を含んで成る。同様に、免疫グロブリン重鎖は、可変重鎖領域および定常重鎖領域と呼

グロブリン遺伝子セグメントの結合前、V、D、Jおよび定常(C)遺伝子セグメントは、大部分、一次レパトリーB細胞の前駆体中にV、D、JおよびC遺伝子セグメントのクラスターとして見つかる。通常、重鎖または軽鎖の遺伝子セグメントの全てが単一の染色体上に比較的近くに密接して置かれている。様々な免疫グロブリン遺伝子セグメントの組換え前のそのようなゲノムDNAは、本明細書中「再配列されていない」ゲノムDNAと呼称される。B細胞分化の間に、V、D、J(または軽鎖遺伝子の場合はVとJのみ)の適当なファミリーメンバーのいずれか1つの遺伝子セグメントが組み換えられて機能的に再配列された重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子を形成する。そのような機能的再配列は、機能的な可変領域をコードするDNAを形成する可変領域セグメントの再配列である。この遺伝子セグメント再配列過程は連続的であると思われる。最初に、重鎖D-J結合点が作られ、次いで重鎖V-DJ結合点と軽鎖V-J結合点が作られる。軽鎖および/または重鎖中の機能的な可変領域のこの初期形態をコードするDNAは、「機能的に再配列されたDNA」または「再配列されたDNA」と呼ばれる。重鎖の場合、そのようなDNAは「再配列された重鎖DNA」と呼ばれ、そして軽鎖の場合、そのようなDNAは「再配列された軽鎖DNA」と呼ばれる。本発明のトランスジェンの機能的再配列を記述するためにも同様な用語が使われる。

機能的な重鎖および軽鎖可変領域を形成するための可変領域遺伝子セグメントの組換えは、組換え応答能のあるV、DおよびJセグメントに隣接する組換えシグナル配列(RSS)により媒介される。組換えを指令するのに必要且つ十分なRSSは、二分子対称ヘプタマー、高ATノナー、および12塩基対または23塩基対のいずれかの中断スペーサー領域を含んで成る。それらのシグナルは、D-J

(またはV-J)組換えを行いそして機能的に相互交換可能である異なる遺伝子座および種の間で保存されている。Gettlingerら(1990), *Science*, 248, 1517-1523およびその中に引用された参考文献を参照のこと。配列 CACAGTGまたはその類似体を含んで成るヘプタマーの後に非保存性配列のスペーサー、次いで配列 ACAAAACCまたはその類似体をもつノナマーが存在する。それらの配列は、各VおよびD遺伝子セグメントのJ側、即ち下流側上に見つかる。生殖細胞型およびJ遺伝子セグメントの直前に、再び2つの組換えシグナル配列があり、最初にノナマーそして非保存性配列により隔てられて次にヘプタマーがある。V_H, V_LまたはDセグメントの後ろのヘプタマーおよびノナマー配列は、それらが組み換わるJ_H, DまたはJ_Lセグメントの前の方のものと相補的である。ヘプタマーとノナマー配列との間のスペーサーは12塩基対の長さかまたは22~24塩基対の長さかのいずれかである。

V, DおよびJセグメントの再配列に加えて、軽鎖のVセグメントとJセグメントとの間および重鎖のDセグメントとJセグメントとの間の可変的組換えによって、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の一次レパートリーにおいて異なる多様性が生まれる。そのような様々な組換えは、そのようなセグメントが結合する正確な場所の変更(ずれ)によって生成される。軽鎖におけるそのようなずれは、典型的にはV遺伝子セグメントの最後のコドンの内部およびJセグメントの最初のコドンの内部に起こる。同様な結合のずれは、重鎖染色体上ではDセグメントとJ_Hセグメントとの間に起こり、10ヌクレオチドほどの多数に及ぶことがある。更に、DセグメントとJ_Hセグメントとの間およびV_HセグメントとDセグメントとの間に、ゲノムDNAによりコードされない幾つかのヌクレオチドが挿入されることがある。それらのヌクレオチドの付加はN領域多様性として

知られている。

VJおよび/またはVDJ再配列の後、再配列された可変領域遺伝子セグメントおよび再配列された可変領域の下流に置かれた1または複数の定常領域遺伝子セグメントの転写は、一次RNA転写物を生成し、これが適当なRNAスプライシングを受けると、全長の重鎖または軽鎖免疫グロブリンをコードするmRNAを生じる。そのような重鎖および軽鎖は、B細胞の細胞膜中への免疫グロブリンの挿入および/またはB細胞からの分泌を行うリーダー配列を含む。このシグナル配列をコードするDNAは、免疫グロブリン重鎖または軽鎖の可変領域を形成するのに使うVセグメントの第一エクソンの内部に含まれる。コードされる免疫グロブリン重鎖および軽鎖ポリペプチド(これは互いの適切な会合によって抗体分子を形成する)を生成するmRNAの翻訳を調節するためにmRNA中に適当な調節配列も存在する。

可変領域遺伝子セグメント中のそのような再配列およびそのような連結中に起こり得る可変的組換えの最終結果は、一次抗体レパートリーの生成である。一般に、この段階まで分化された各B細胞は、単一の一次レパートリー抗体を産生する。この分化過程の間に、機能的に再配列されたIg遺伝子内に含まれるもの以外の遺伝子セグメントの機能的再配列を抑制する細胞現象が起こる。二倍体B細胞がそのような単一特異性を維持する過程は、対立遺伝子排除と呼ばれる。

二次レパートリー

一次レパートリーを含んで成る配列の組の中からの免疫グロブリンを発現するB細胞クローンは、外来抗原に反応させるのにすぐに利用可能である。単純なVJおよびVDJ結合により生じる限定さ

れた多様性のため、いわゆる一次応答によって産生される抗体は比較的低い親和性のものである。2つの異なる型のB細胞がこの初期応答を作成する：一次抗体形成細胞の前駆体および二次レパートリーB細胞の前駆体(Lintonら(1989), *Cell*, 59, 1049-1059)。最初の型のB細胞は成る種の抗原に反応してIgM分泌性形質細胞に成熟する。他方のB細胞は、T細胞依存性成熟過程に入ることで、抗原への初期暴露に反応する。このT細胞依存性B細胞成熟の最中に、体細胞突然変異と呼ばれる過程(しばしば高次突然変異とも呼ばれる)によって第二水準の多様性が作られる。それらの一次レパートリーB細胞は、それらの表面上の免疫グロブリン分子を使って外来抗原を結合し細胞内に取り込む。外来抗原がタンパク質であるかまたは別のタンパク質抗原に物理的に結合されるならば、そのタンパク質抗原は処理されそして主要組織適合性複合体(MHC)分子により細胞表面に提示されてヘルパーT細胞となり、これが次いでB細胞の成熟を誘導する。Lanzavecchia (1985), *Nature*, 314, 537。このB細胞の完全成熟は二次応答として知られている。

抗原により感作されたB細胞クローンのT細胞依存性成熟の間に、細胞表面上の抗体分子の構造が2つの経路で変化する。第一は、定常領域が非IgMサブタイプにスイッチし、そして可変領域の配列が多数の単一アミノ酸置換により変更されて一層高い親和性の抗体分子を生成する。一層高い親和性のクローンを選択した後、Ig媒介免疫応答によって特徴付けられる非常に特異的に且つ強固に結合する免疫グロブリンを生産するのは、この体細胞突然変異の過程である。

前に指摘したように、Ig重鎖または軽鎖の各可変領域は、抗原結合領域を含む。二次応答の間の体細胞突然変異は、アミノ酸および塩基配列決定により、3つの相補性決定領域(CDR1, CDR2およびCDR3:これは超可変領域1, 2または3とも呼ばれる)を含むV領域

の至るところで起こることが決定されている。CDR1とCDR2は可変遺伝子セグメント内部に位置し、一方CDR3は大部分がV遺伝子セグメントとJ遺伝子セグメントの間またはV, DおよびJ遺伝子セグメントの間の組換えの結果である。CDR1, 2または3を構成しない可変領域の部分は、一般に、FR1, FR2, FR3およびFR4と名付けられたフレームワーク領域と呼ばれる。図1を参照のこと。高度突然変異の間に、再配列されたDNAが変異されて異なるIg分子を有する新しいクローンを生じる。外来抗原に対して一層高い親和性を有するそれらのクローンがヘルパーT細胞によって選択的に増大されて、発現抗体の親和力成熟を引き起こす。クローン選択は、典型的にはCDR1, CDR2および/またはCDR3領域中に新規変異を含むクローンの発現をもたらす。しかしながら、抗原結合領域の特異性および親和性に影響を及ぼすようなそれらの領域の外側の変異も起こる。

異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物

本発明の1観点では、トランスジェニック非ヒト動物は、少なくとも1つの本発明の免疫グロブリントランスジェン(後述)を非ヒト動物の接合子または初期胚中に導入することにより製造される。本発明に有用である非ヒト動物は、一般に、免疫グロブリン遺伝子セグメントを再配列して一次抗体応答を生ぜしめることができ、そしてその上、そのような再配列されたIg遺伝子の体細胞突然変異によって二次応答を開始することができる、任意の哺乳類を包含する。特に好ましい非ヒト動物はマウスまたは霊長類の他のメンバーである。マウスはそれらの免疫系(マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子座のゲノム構成を含む)が広範囲に渡り研究されているために特に有用である。例えば *Immunoglobulin Genes*, Academic Press, T. Honjo, F.W. Alt および T.H. Rabbitts 編 (1989) を参

照のこと。

しかしながら、本発明はマウスの使用に限定されない。むしろ、一次および二次抗体応答を開始することができる任意の非ヒト哺乳動物を使用することができる。そのような動物としては、非ヒト霊長類、例えばチンパンジー、ウシ、ヒツジおよびブタの種、齧歯科の他のメンバー、例えばラット、並びにウサギおよびモルモットが挙げられる。特に好ましい動物はマウス、ラット、ウサギおよびモルモットであり、最も好ましくはマウスである。

本明細書中で使用する時、用語「抗体」は、ジスルフィド結合により一緒に連結された2つの同一の軽ポリペプチド鎖と2つの同一の重ポリペプチド鎖を少なくとも含んで成る糖タンパク質を言う。重および軽ポリペプチド鎖は各々、抗原と相互作用する結合ドメインを含む可変領域（通常はポリペプチド鎖のアミノ末端部分）を含む。重および軽ポリペプチド鎖は各々、ポリペプチド鎖の定常領域（通常はカルボキシ末端部分）も含んで成り、その配列の一部は、免疫系の種々の細胞、或る種の食細胞および典型的補体系の第一成分（C1q）を含む宿主組織への免疫グロブリンの結合を媒介する。

本明細書中で使用する時、「異種抗体」は、そのような抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物に関連して定義される。それは、トランスジェニック非ヒト動物から成らない生物において見つかるものに対応するアミノ酸配列を有するかまたはDNA配列をコードする抗体である。よって、様々な重鎖または軽鎖遺伝子セグメントを含むトランスジェニックの再配列前に、例えばハイブリダイゼーションまたはDNA配列決定により、そのような遺伝子セグメントを容易に同定することができる。例えば、本発明の一態様では、ヒトゲノム由来の様々な遺伝子セグメントが再配列されていない形で重鎖

て二次応答中の高度突然変異により導入される突然変異のためである。DNA配列中（並びにアミノ酸配列中）のそのような変形にもかかわらず、前記再配列されたトランスジェニックによりコードされる抗体は、本発明を実施するのに用いる非ヒト動物中で通常遭遇するものと異種であるDNAおよび/またはアミノ酸配列を有することは容易に明らかであろう。

用語「実質的に同じ」は、ポリペプチドに対して言及する時、問題のポリペプチドまたはタンパク質が、天然のタンパク質全部またはその部分と少なくとも約30%の一致、通常は少なくとも約70%の一致、好ましくは少なくとも約95%の一致を示すことを指稱する。本明細書中で使用する時、用語「単離された」、「実質的に純粋な」および「実質的に相同な」は、本明細書中で相互に交換可能に用いられ、そして本来それに付随する成分から分離されているポリペプチドタンパク質を言う。典型的には、単量体タンパク質は、試料の少なくとも約60-75%が単一のポリペプチド骨格を示す時に実質的に純粋である。微量の変形または化学的修飾は典型的には同じポリペプチド配列を共有する。実質的に純粋なタンパク質は、典型的にはタンパク質試料の約85-90%以上、より普通には約95%を含んで成り、好ましくは約99%以上の純度であろう。タンパク質純度または均質性は、当業界で公知である多数の手段により、例えばタンパク質試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、染色によってポリアクリルアミドゲル上の単一ポリペプチドバンドを視覚化することにより、指稱することができる。ある目的では、高分解能が必要であり、HPLCまたは類似の手段が使われるだろう。ポリペプチドは、天然状態では該ポリペプチドに付随している生来の汚染物から分離された時、天然会合成分を実質的に含まない。よって、ポリペプチドが天然に由来する細胞とは異なる細胞系中で合成されたポリ

および軽鎖トランスジェニックに使われる。この態様では、そのようなトランスジェニックがマウスに導入される。軽鎖および/または重鎖トランスジェニックの再配列されていない遺伝子セグメントは、マウスゲノム中の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントと識別可能である。ヒト種に固有のDNA配列を有する。それらは生殖細胞やB細胞から成らない体細胞では再配列されていない形態でそしてB細胞では再配列された形態で容易に検出することができる。

本発明の別の態様では、トランスジェニックは、再配列された重鎖および/または軽鎖免疫グロブリントランスジェニックを含んで成る。そのようなトランスジェニックの機能的に再配列されたVDJまたはVJセグメントに相当する特定セグメントは、マウス中の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントから明らかに識別可能である免疫グロブリンDNA配列を含む。

そういったDNA配列の相違は、マウスB細胞によりコードされるアミノ酸配列に比較するとそのようなヒト免疫グロブリントランスジェニックによりコードされるアミノ酸配列にも反映される。よって、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされる免疫グロブリンエピトープに特異的な抗体を使って、本発明のトランスジェニック非ヒト動物において、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列を検出することができる。

ヒトまたは他の種由来の再配列されていないトランスジェニックを含むトランスジェニックB細胞は、適当な遺伝子セグメントを機能的に組換えると、機能的に再配列された軽鎖および重鎖可変領域を形成する。そのような再配列されたトランスジェニックのDNAは、大部分が、前記再配列されたトランスジェニックを得た遺伝子セグメントのDNA配列と正確には一致しないであろうと理解すべきである。これは主に、可変的組換えの間に導入される変形のためであり、そし

ペプチドは、その天然会合成分を実質的に含まないだろう。

再配列されていないトランスジェニック

本明細書中で使用する時、「再配列されていない免疫グロブリン重鎖トランスジェニック」は、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの多様性遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。前記重鎖トランスジェニックの各遺伝子セグメントは、前記トランスジェニックが導入される非ヒト動物から成らない種の免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントをコードするDNAから誘導されるか、またはそれに相当する配列を有する。同様に、本明細書中で使用する時、「再配列されていない免疫グロブリン軽鎖トランスジェニック」は、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび少なくとも1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。ここで、前記軽鎖トランスジェニックの各遺伝子セグメントは、前記軽鎖トランスジェニックが導入される非ヒト動物から成らない種の免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAから誘導されるか、またはそれに相当する配列を有する。

本発明のこの観点でのそのような重鎖および軽鎖トランスジェニックは、再配列されていない形態で上述の遺伝子セグメントを含有する。即ち、重鎖トランスジェニック中のV、DおよびJセグメントの間および軽鎖トランスジェニック中のVとJセグメントの間には、適当な組換えシグナル配列（RSS）が置かれる。加えて、そのようなトランスジェニックは、定常領域遺伝子セグメントをVJまたはVDJ再配列された可変領域と結合するための適当なRNAスプライシングシグナルも含む。

重鎖トランスジェニックが複数のC領域遺伝子セグメント、例えばヒ

トゲノムからのC μ およびC γ を含む限りでは、各定常領域遺伝子セグメントの上流で且つ可変領域遺伝子セグメントの下流に、免疫グロブリンクラススイッチ、例えばIgMからIgGへのクラススイッチを考慮した前記定常領域間の組換えを可能にするため、下記に説明するような「スイッチ」領域が組み込まれる。そのような重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンは、可変領域遺伝子セグメントの上流に置かれたプロモーター領域を含む転写調節配列(OCTAおよびTATAモチーフを含む)も含有する。

プロモーターに加えて、主にB系列細胞中で機能する他の調節配列が使われる。例えば、軽鎖トランスジェン上の好ましいはJセグメントと定常領域遺伝子セグメントとの間に置かれた軽鎖エンハンサー配列は、トランスジェンの発現を増強し、それによって対立遺伝子排除を促進するために使われる。重鎖トランスジェンの場合、調節エンハンサーも使われる。

上述のプロモーターおよびエンハンサー調節配列は包括的に記載されているけれども、そのような調節配列は非ヒト動物に対して異種であることができ、異種トランスジェン免疫グロブリン遺伝子セグメントが得られるゲノムDNAから誘導することができる。あるいは、そのような調節遺伝子セグメントは、重鎖および軽鎖トランスジェンを含む、非ヒト動物または密接に関連した種のゲノム中の対応する調節配列から誘導される。そのような調節配列は、トランスジェンの転写および翻訳を最大にし、その結果対立遺伝子排除を誘導しそして比較的高いレベルのトランスジェン発現を提供するために用いられる。

好ましい態様では、重鎖および軽鎖Igトランスジェン上に含まれる各免疫グロブリン遺伝子セグメントは、該トランスジェンを導入する予定の非ヒト動物に対して異種である種または個体のゲノム

DNA、cDNAもしくはその部分から誘導されるか、またはそれに対応する配列を有する。結果として、そのような遺伝子セグメントがトランスジェニック非ヒト動物において機能的に再配列されそして高次突然変異された時、そのような重鎖および軽鎖トランスジェンによりコードされる異種抗体は、Ig遺伝子セグメントを誘導した生物において療法的に利用すると所望の抗原に対する特異的な効能を提供する、アミノ酸配列並びに線形的な二次および三次構造を有するであろう。その上、そのような抗体は、処置される生物に対して「外来」である抗体に比較して、実質的に減少された免疫原性を示す。

例えば、好ましい態様では、遺伝子セグメントはヒトから誘導される。そのような重鎖および軽鎖トランスジェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物は、そのような動物に投与される特異抗原に対してIg媒介免疫応答を開始することができる。そのような動物中では異種ヒト抗体を産生することのできるB細胞が産生される。不活化後、および適当なモノクローナル抗体(Mab)、例えばハイブリドーマの選択後、治療用ヒトモノクローナル抗体の源が提供される。そういったヒトMabは、ヒトに療法的に投与した時に実質的に減少された免疫原性を有する。

ヒト免疫グロブリントランスジェンを含む本発明のトランスジェニック動物において異種抗体を惹起せしめるのに使うことができる抗原の例としては、細菌、ウイルスおよび腫瘍抗原、並びに移植拒絶反応または自己免疫に関係がある特定のヒトB細胞およびT細胞抗原が挙げられる。

好ましい態様はヒト遺伝子セグメントを含む重鎖および軽鎖トランスジェンの作製を開示するけれども、本発明はそれに限定されない。この点に関しては、本明細書中に記載される教示は、ヒト以外

の種からの免疫グロブリン遺伝子セグメントの使用に合わせて容易に改変できると理解すべきである。例えば、本発明の抗体によるヒトの治療処置に加えて、適当な遺伝子セグメントによりコードされる治療抗体を使って、獣医学的に用いられるモノクローナル抗体を産生することができる。例えば、種間連鎖モノクローナル抗体による家畜の処置も本発明により期待される。そのような抗体は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ等の種からの免疫グロブリン遺伝子セグメントを含むトランスジェンを使うことによって、同様に産生せしめることができる。

クラススイッチ

μ または δ 定常領域の使用は、大部分は、IgMおよびIgDを単一細胞中で同時発現できるようにする、交互スプライシングによって決定される。その他の重鎖イソタイプ(γ 、 α および ϵ)は、遺伝子再配列現象がC μ およびC δ エクソンを欠失させた後で本質的にのみ発現される。この遺伝子再配列過程はクラススイッチと呼ばれ、各重鎖遺伝子(δ を除く)のすぐ上流に置かれたいわゆるスイッチセグメントの間での組換えによって起こる。個々のスイッチセグメントは長さが2~10 kbであり、主として短い反復配列から成る。組換えの正確な位置は個々のクラススイッチ現象ごとに異なる。

B細胞の成熟の間にトランスジェンがイソタイプをスイッチできることは、トランスジェニックマウス中で直接試験されたことはない。しかしながら、トランスジェンはこの機能を成し遂げるだろう。Durdikら(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2346-2350は、再配列されたマウス μ 重鎖遺伝子構成物をマイクロインジェクトすると、4つの独立したマウス系列において、高比率のトランスジェニックB細胞がIgMよりもむしろIgGに関係するトランスジェンに

よりコードされる可変領域を発現することを見出した。トランスジェンと別の染色体上の内因性 γ 定常領域との間でイソタイプスイッチが起こったらしい。

本明細書中で使用する時、用語「スイッチ配列」は、スイッチ組換えを招くそれらのDNA配列を言う。「スイッチ供与体」配列、典型的には μ スイッチ領域は、スイッチ組換え中に欠失されるであろう定常領域の5' (即ち上流)にあるだろう。「スイッチ受容体」領域は、欠失されるであろう定常領域と代替定常領域(例えば γ 、 ϵ 等)との間であろう。組換えが常にかかる特異部位は1つもないので、典型的には最終遺伝子配列は構成物から予想不可能であろう。

μ 遺伝子のスイッチ(S)領域、S μ は、コード配列の約1~2 kb 5'側に位置し、そして(GAGCT)、(GGGGT)の形の配列の多数の繰返し反復から成る。ここでnは通常2~5であるが、17ほどの大きさに及ぶことができる。(T. Nikaidoら(1981): *Nature*, 292: 845-848を参照のこと。)

他のC γ 遺伝子の5'にも、数千塩基対に及ぶ同様な内部反復性スイッチ配列が見つかっている。S α 領域は配列決定されており、縦列に反復した80 bpの相同性単位から成ることが判明した。一方、S γ_1 、S γ_2 、およびS γ_3 は全て、互いに非常に類似している反復した48 bpの相同性単位を含む。(P. Szurekら(1985), *J. Immunol.* 135:620-626 およびT. Nikaidoら(1982), *J. Biol. Chem.* 257:7322-7329を参照のこと。)全ての配列決定されたS領域は、S μ 遺伝子の基本的反復配列であるペンタマーGAGCT およびGGGGTの多数の発生を含む(T. Nikaidoら(1982), *J. Biol. Chem.* 257:7322-7329); 他のS領域では、それらのペンタマーはS μ のように正確に縦列に反復されていないが代わりに大きな反復単位中に埋められている。

S γ_1 領域は追加の高次構造を有し、即ち、2つの直接反復配列が

49 bp の縦列反復の2つのクラスターの各々に隣接する (M.R. Moraitら (1986), *J. Immunol.*, 136: 2674-2683を参照のこと)。ヒトH鎖遺伝子のスイッチ領域はそれらのマウス同族体に非常に類似していることがわかっていて、一般に、V-J組換えの酵素的機構とは異なり、スイッチ機構は、明らかに生殖細胞S前期体の反復相同領域の種々の整列を適応させることができ、次いで該配列を異なる位置で一直線上に連結することができる。 (T.H. Rabbittsら (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9: 4509-4524およびJ. Ravetchら (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6734-6738を参照のこと。)

クラススイッチの誘導は、スイッチセグメントの上流で始まる繁殖不能転写物(stelile transcript)に関係があるらしい (Lutzkerら (1988) *Mol. Cell Biol.*, 8: 1849; Stavnezerら (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7704; EsserおよびRadbruch (1989) *EMBO J.*, 8: 483; Bertonら (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2829; Rothmanら (1990) *Int. Immunol.*, 2: 612)。例えば、観察されるIL-4による $\gamma 1$ 繁殖不能転写物の誘導およびIFN- γ による阻害は、IL-4がB細胞中での $\gamma 1$ へのクラススイッチを促進し、IFN- γ が $\gamma 1$ 発現を阻害するという観察結果と一致する。理論的には、クラススイッチを受けさせようとするトランスジェン構成物は、それらの繁殖不能転写物を調節するのに必要なシス作用性配列の全てを含むべきである。トランスジェニックマウスにおいてクラススイッチ($\alpha\mu$ および $\epsilon\mu$)を獲得する別法は、ヒト μ 遺伝子に隣接する400 bpの直接反復配列の包含である (Yasuiら (1989) *Eur. J. Immunol.*, 19: 1399)。それらの2配列間の相同組換えは、IgDのみのB細胞において μ 遺伝子を削除する。

の5 Mb以上または全ゲノムのほぼ0.2%を占める。各遺伝子座は、B細胞発達の間に連結領域セグメント(および、重鎖遺伝子座では多様性領域セグメント)と組換わって完全なV領域エクソンを形成する複数の可変セグメントから成る。そのような再配列された軽鎖遺伝子は3つのエクソン: シグナルペプチドエクソン、可変領域エクソンおよび定常領域エクソンから成る。再配列された重鎖遺伝子は幾分複雑である。それはシグナルペプチドエクソン、可変領域エクソン、および各々が数個のエクソンによりコードされる多ドメイン定常領域の縦列整列領域から成る。定常領域遺伝子の各々は異なる免疫グロブリンクラスの定常部分をコードする。B細胞発達の間に、定常領域に近いV領域が欠失されて新規重鎖クラスの発現をもたらす。各重鎖クラスについては、RNAスプライシングの別パターンが経膜型と分泌型の両方の免疫グロブリンをもたらす。

ヒト血清抗体分子の約40%が λ 軽鎖を含む。この遺伝子座(染色体22に位置決定される)の構造は、十分に特徴付けられた最少のものである(図2)。それは、各々が単一のJセグメントに結合している6つの定常領域遺伝子の縦列配列の上流の未知数のVセグメントから成る。加えて、結合したJセグメントを有する更に2つの定常領域セグメントが単離されているが、 λ クラスターの残部とのそれらの結合は確立されておらず、それらが使われるかどうかかわかっていない。E. Selsingら, "Immunoglobulin Genes", Academic Press, T. Honjo, F.W. Alt およびT.H. Rabbitts 編 (1989)。

κ 軽鎖遺伝子座は、染色体2上の3つのクラスター上に広がっている(図3)。それぞれ850 kbおよび250 kbにわたる最初の2つのクラスターは可変領域遺伝子セグメントのみを含む。約1 Mbにわたる三番目のクラスターは約40個のV遺伝子セグメントを含み、その下流に5つのJセグメントのクラスターがあり、次いで単一の定常

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は当業者に公知である種々の技術により得ることができる。簡単に言えば、所望の抗原により免疫処置された動物の脾細胞を、通常はミエロマ細胞との融合により、不死化せしめる (KohlerおよびMilstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511-519 (1976))。不死化の別法としては、エプスタインバーウイルス、癌遺伝子もしくはレトロウイルスによる形質転換、または当業界において公知である別の方法が挙げられる。単一の不死化細胞から生じたコロニーを、抗原に対する所望の特異性および親和性を有する抗体の産生についてスクリーニングし、そして脊椎動物宿主の腹腔中への注入を含む種々の技術によって、そのような細胞により産生されるモノクローナル抗体の収量を増大させることができる。それらの技術に有用である種々の方法は、例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (1988)中に記載されており、免疫グロブリンを産生するための動物の免疫処置; モノクローナル抗体の産生; プローブとして使われる免疫グロブリンの標識; 免疫アフィニティ精製; およびイムノアッセイを包含する。

トランスジェニック一次レポトリ

A. ヒト免疫グロブリン遺伝子座

トランスジェニック機能のための重要な必要条件は、広範囲の抗原に対して二次免疫応答を開始させるのに十分な程度に多様である一次抗体レポトリの作製である。種々の重鎖および軽鎖遺伝子セグメントをコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座のサイズは非常に大きい。例えば、ヒトゲノムでは、 λ 軽鎖遺伝子座、 κ 軽鎖遺伝子座および重鎖遺伝子座の3つの別々の遺伝子座は、合わせるとDNA

領域遺伝子セグメントがある。合計84個のV遺伝子セグメントが同定されており、そしてそのほぼ半分が偽遺伝子であると考えられる (Zachau (1989) *Immunoglobulin Genes*, Academic Press, T. Honjo, F.W. AltおよびT.H. Rabbitts 編, 91-110中)。C κ 領域の約25 kb 下流に「 κ 欠失要素 (κ de)」がある。この κ de配列は上流配列と組み替わって、 λ 軽鎖発現B細胞において κ 定常領域の欠失を引き起こす。これは、 κ と λ 遺伝子の両方を上手く再配列する細胞において同位排除を引き起こす。

ヒト重鎖遺伝子座は最大であり且つ最も多様である。それは2 Mbにわたる約200個のV遺伝子セグメント、約40 kbにわたる約30個のD遺伝子セグメント、3 kbの範囲内に密集した6個のJセグメント、および約300 kbにわたる9個の定常領域遺伝子セグメントから成る。全遺伝子座は、染色体14の長い方の腕の遠位部分約2.5 Mbに及ぶ(図4)。重鎖Vセグメントは配列類似性に基づいて6つのファミリーに分類することができる。約60のV $\mu 1$ ファミリー、30のV $\mu 2$ セグメント、80のV $\mu 3$ セグメント、30のV $\mu 4$ セグメント、3つのV $\mu 5$ セグメントおよび1つのV $\mu 6$ セグメントがある。Berman, J.E.ら (1988), *EMBO J.*, 7: 727-738。ヒト重鎖遺伝子座では、関連するVセグメントが密集しているマウス遺伝子座とは異なり、個々のVファミリーのメンバーが入り交じっている。VH6ファミリーの単一メンバーがVセグメントの最も近位にあり、定常領域遺伝子セグメントの90 kb 以内にマッピングされる。Sato, T.ら (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154: 265-271。機能的DおよびJセグメントは全て、この90 kb 領域のなかにあると思われる (Siebenlistら (1981), *Nature*, 294: 631-635; Matsudaら (1988), *EMBO J.*, 7: 1047-1051; Bulwelaら (1988), *EMBO J.*, 7: 2003-2010; Ichiharaら (1988), *EMBO J.*, 7: 4141-4150; Bermanら

(1988), *EMBO J.*, **7**, 727-738)。

B. 遺伝子断片トランスジェン

1. 重組トランスジェン

好ましい態様では、免疫グロブリン重組および軽組トランスジェンは、ヒト由来の再配列されていないゲノムDNAを含んで成る。重組の場合、好ましいトランスジェンは670～830 kbの長さを有するNot I断片を含んで成る。この断片の長さは、3'制限部位が実際にマッピングされていないため、不明瞭である。しかしながら、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 遺伝子セグメントとの間にあることが知られている(図4参照)。この断片は、6つの既知V_Hファミリーの全部のメンバー、DおよびJ遺伝子セグメント、並びに μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$ および $\alpha 1$ 定常領域を含む。Bermanら(1988), *EMBO J.*, **7**, 727-738。このトランスジェンを含有するトランスジェニックマウス系は、B細胞の発達に必要なとされる重組クラスの全部を正しく発現し、そしてほとんどの抗原に対して二次応答を開始するのに十分な程多数の可変領域のレパートリーを発現する。

2. 軽組トランスジェン

ヒト軽組遺伝子座からの必要な遺伝子セグメントおよび調節配列を全て含有するゲノム断片を同様に作製することができる。そのような構成物は実施例に記載される。

C. 生体内組換えにより細胞内的に作製されるトランスジェン

単一DNA断片上の重組遺伝子座の全部または一部分を単離する必要はない。例えば、ヒト免疫グロブリン重組遺伝子座からの670-830 kb Not I断片は、トランスジェン作製(transgenesis)の間に非ヒト動物の生体内で形成させることができる。そのような生体内トラン

生体内トランスジェン作製を利用する好ましい態様では、各々の重複するDNA断片は、好ましくは第一のDNA断片の末端部分と第二のDNA断片の末端部分の間で重複する実質的に相同なDNA配列を有する。DNA断片のそのような重複部分は、好ましくは約500 bp～約2000 bp、最も好ましくは1.0 kb～2.0 kbを含む。生体内でトランスジェンを形成させるための重複DNA断片の相同組換えは、1990年8月29日にU.S.S.N. 07/574,747号のもとに出願された「DNA断片の相同組換えによるDNAの細胞内生成(Intracellular Generation of DNA by Homologous Recombination of DNA Fragments)」と題する一般譲渡されたU.S.特許出願明細書に更に詳しく記載されている。

D. 小遺伝子座トランスジェン

本明細書中で使用する時、「免疫グロブリン小遺伝子座」なる用語は、通常は約150 kb未満、典型的には約25～100 kbのDNA配列であって、前記DNA配列が少なくとも1つの実質的不連続性(例えば、相同ゲノムDNA配列に関して、通常は少なくとも約2～5 kb、好ましくは10～25 kbまたはそれ以上の欠失)を有するような、次のものを各々少なくとも1つ含むDNA配列を言う：機能的可変(V)遺伝子セグメント、機能的連結(J)領域セグメント、機能的定常(C)領域遺伝子セグメント、および重組小遺伝子座の場合には、機能的多様性(D)領域セグメント。軽組小遺伝子座トランスジェンは、長さが少なくとも25 kb、典型的には50～80 kbであるだろう。重組トランスジェンは、単一の定常領域と不完全なスイッチ領域を有するものは少なくとも約30 kbであるのに対して、スイッチ領域に作用可能に連結された2つの定常領域を有するものは典型的には約70～80 kb、好ましくは少なくとも約60 kbの長さであろう。更に、小遺伝子座の個々の要素は好ましくは生殖細胞(ジャームラ

スジェン作製は、2以上の重複するDNA断片を非ヒト動物の胚性細胞に導入することにより行われる。DNA断片の重複部分は、実質的に相同であるDNA配列を有する。胚性細胞内に含まれるレコンビナーゼに暴露されると、重複しているDNA断片が適切な方向において相同的に組み換わって670-830 kbのNot I重組断片を形成する。

しかしながら、生体内トランスジェン作製は、そのサイズのために現存の技術による作製または操作が困難であるかまたは不可能である多数の免疫グロブリントランスジェンを形成せしめるのに使うことができると理解すべきである。例えば、生体内トランスジェン作製は、YACベクター(MurrayおよびSzostak (1983), *Nature*, **305**, 189-193)により操作することができるDNA断片よりも大きい免疫グロブリントランスジェンを作製するのに有用である。そのような生体内トランスジェン作製は、トランスジェニック非ヒト動物から成らない種の実質的に完全な免疫グロブリン遺伝子座を非ヒト動物中に導入する場合にも使うことができる。幾つかの研究グループが、YACベクター中に50～200 kbのDNA断片を含むライブラリーを好結果に作製しており(Burkeら(1987), *Science*, **236**, 806-812; Traverら(1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5898-5902)そしてポリアミン融合を使って200～約1000 kbのサイズの範囲でYACライブラリーを製造している(McCormickら(1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9991-9995)けれども、ヒト定常領域免疫グロブリン遺伝子座の670-830 kb Not I断片よりも実質的に大きくカバーする多数の重複断片が本明細書中に開示される方法によって大型のトランスジェンを容易に製造できると予想される。

ゲノム免疫グロブリントランスジェンを形成させることに加えて、実施例に記載の如く「小遺伝子座」トランスジェンを形成させるのにも生体内相同組換えを使うことができる。

イン)配置にあり、そして小遺伝子座の該要素により完全にコードされる多様な抗原特異性を有する機能的抗体分子を発現するように、トランスジェニック動物の前駆体B細胞において遺伝子再配列を受けることができる。

他の好ましい態様では、免疫グロブリン重組および軽組トランスジェンはV_H, D_H, JおよびC遺伝子セグメントを各々1つまたは複数含んで成る。適当なタイプの遺伝子セグメントの少なくとも1つが小遺伝子座トランスジェンに組み込まれる。重組トランスジェンのCセグメントに関しては、トランスジェンが少なくとも1つの μ 遺伝子セグメントと、少なくとも1つの他の定常領域遺伝子セグメント、より好ましくは γ 遺伝子セグメント、最も好ましくは $\gamma 3$ または $\gamma 1$ 遺伝子セグメントとを含むことが好ましい。この優先性は、体細胞突然変異および分泌形の高親和性非IgM免疫グロブリンの産生に備えて、コードされる免疫グロブリンのIgM形とIgG形との間のクラススイッチを考慮したものである。他の定常領域遺伝子セグメントも使うことができ、例えばIgD, IgAおよびIgEの産生をコードするものである。

ヒトの重組J領域セグメントは、3 kbのDNA長さにおいて密集した6個の機能的Jセグメントと3個の偽遺伝子を含んで成る。それが比較的小さいサイズであることとそれらのセグメントが μ 遺伝子および δ 遺伝子の5'部分と一路に単一の23 kb SfiI/SpeI断片として単離できること(Sadoら(1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 246-271)を仮定すれば、小遺伝子座構成物において全部のJ領域遺伝子セグメントを使うことが好ましい。更に、この断片は μ 遺伝子と δ 遺伝子の間の領域に広がるため、 μ 発現に必要なとされるシス結合した3'調節要素の全部を含むことが適当である。更に、この断片は完全なJ領域を含むため、重組エンハンサー

とμスイッチ領域を含む (Wills ら(1983), *Nature*, 306, 809 ; YancopoulosおよびAlt (1986) *Ann. Rev. Immunol.*, 4, 339-368)。それは: V D J 結合を開始させて一次レパトリー-B細胞を形成させる転写開始部位も含む (Yancopoulos および Alt (1985) *Cell*, 40, 271-281)。あるいは、23 kb Sfil/SpeI 断片の代わりに、D 領域の一部を含む36 kb BssHII/SpeI 断片を使うことができる。そのような断片の使用は、効率的D-J結合を促進させる5' 隣接配列の量を増加させる。

ヒトD領域は、縦列に結合した4または5個の相同な9 kbの亜領域から成る (Siebenlistら(1981), *Nature*, 294, 631-635)。各亜領域は10個までの個々のDセグメントを含む。それらのセグメントの一部はマッピングされており、それを図4に示す。2つの異なる方策を使って小遺伝子座D領域を作製する。第一の方策は、1つまたは2つの反復D亜領域を含む短いDNAの連続鎖の中に置かれたそれらのDセグメントのみを使うものである。候補となるのは、12個の個々のDセグメントを含む単一の15 kb 断片である。DNAのこの断片は2つの連続するEcoRI 断片から成り、そして完全に配列決定されている (Ichiharaら(1988), *EMBO J.*, 7, 4141-4150)。12のDセグメントが一次レパトリーに十分であろう。しかしながら、D領域の分散性質があるとすれば、別の方策は、幾つかの不連続D断片含有断片を一緒に連結して、より多数のセグメントを有する一層小型のDNA断片を作製することである。

重鎖小遺伝子座トランスジェンを作製するのには、少なくとも1つ、好ましくは複数のV遺伝子セグメントが使われる。隣接配列と一緒に1つまたは2つの再配列されていないVセグメントを含む10~15 kb のDNA断片を単離する。特許付けられたヒトハイブリドーマ、例えば抗シトメガロウイルス抗体を産生するもの (Nenkirk ら

(1988) *J. Clin. Invest.*, 81, 1511-1518) の転写V領域から決定されたユニーク5' 配列から作製したプローブを使って、そのようなDNAを含むクローンを選択する。重鎖mRNAの5' 非翻訳配列を使って、この抗体を作製したもとの生殖細胞型Vセグメントを単離するためのユニークなヌクレオチドプローブ (好ましくは長さが40ヌクレオチド) を作製する。既知抗原に対する抗体中に含まれることが知られているVセグメントを使うと、このVセグメントが機能的であることを保証するだけでなく、二次免疫応答におけるトランスジェン関与の分析も助ける。このVセグメントを上記のように小遺伝子座のD領域および定常領域断片と融合せしめて、小遺伝子座重鎖トランスジェンを作製する。

あるいは、YACライブラリーから、多数のV領域セグメントを含む大きな連続したDNA断片を単離する。様々な数のV領域セグメントを含む種々の大きさのDNA断片を、小遺伝子座トランスジェン構成物中でヒト抗体レパトリーを提供する能力について試験する。YACベクター (MurrayおよびSzostak (1983), *Nature*, 305, 189-193)、F因子ベースのプラスミド (O'Connerら(1989), *Science*, 244, 1307-1312) または上述の重複断片の組換えを使った生体内作製を用いて、幾つかの不連続のVセグメント含有断片から1つの大きな断片を構築することも可能である。あるいは、合成V領域レパトリー (後述) を使うこともできる。

小遺伝子座軽鎖トランスジェンは、ヒトλまたはκ免疫グロブリン遺伝子座から同様にして作製することができる。κ軽鎖小遺伝子座の作製は、重鎖小遺伝子座の作製に非常に類似しているが、ただし、それはサイズがより小さく複雑性がより低いために、ずっと単純である。ヒトκ遺伝子座は1つだけの定常領域セグメントを有する。5' および3' エンハンサーと一緒にこのセグメント、並びに

全部で5つの機能的Jセグメントを、単一の10 kb DNA断片において単離することができる。この断片は、重鎖小遺伝子座について記載したように作製された小遺伝子座V領域と一緒に同時注入される。

例えば、複数のDNA断片、少なくとも2つ、3つまたは4つのDNA断片 (その各々はV領域配列、D領域配列、J領域配列および定常領域配列、DとJと定常領域配列、または定常領域配列のいずれかであり、ここで、各配列はヒト遺伝子配列に実質的に相同である) から、V、D、Jおよび定常領域配列をコードする、例えば約75kbの、免疫グロブリン重鎖小遺伝子座トランスジェン構成物を形成せしめることができる。好ましくは、前記配列は転写調節配列に作用可能に連結され、そして再配列を受けることができる。2以上の適当に置かれた定常領域配列 (例えばμおよびγ) およびスイッチ領域では、スイッチ組換えも起こる。複数のDNA断片から同様に形成された、ヒトDNAに実質的に相同であり且つ再配列を受けることができる典型的な軽鎖トランスジェン構成物は、V、Dおよび定常領域をコードする少なくとも2つ、3つまたは4つのDNA断片を含み、ここで各断片はV領域配列、J領域配列および定常領域配列か、または定常領域配列かのみを含んで成るだろう。

E. 機能的V遺伝子セグメントの決定方法および

合成Vセグメントレパトリーの作製方法

遺伝子セグメントの様々なファミリー、即ちV、D、JおよびC領域遺伝子セグメントのうち、V遺伝子セグメントの数は通常、D、JおよびC領域遺伝子セグメントそれぞれに対応する遺伝子セグメントの数を遙かに上回る。産生される抗体の約90%が単一のV遺伝子セグメントを使うウサギ系 (KnightおよびBecker(1990), *Cell*, 60, 963-970) への調性によれば、限定数のV領域遺伝子セグメン

ト、1ほど少数のV領域遺伝子セグメント、を含む重鎖および軽鎖トランスジェンを製造することが可能である。従って、免疫グロブリン媒介性免疫応答を開始する時に、特定生物、例えばヒトにより、どのV領域遺伝子セグメントが使われるかを決定する方法をもつことが望ましい。このアプローチによれば、単一のV遺伝子セグメントは、JまたはDJ遺伝子セグメントと組み合わせると、一次レパトリーの生成に十分な多様性をCDR3に提供することができ、これは、体細胞突然変異を受けると、可変領域の至るところで、例えば高親和性抗体の産生のためにはCDR1およびCDP2において、更なる多様性を提供することができる。

本発明のこの観点では、免疫応答の間に生物体によりどのV遺伝子セグメントが使われるかを決定するための方法およびベクターが提供される。この方法は、B細胞のポリA⁺ RNA から合成したcDNA中にどのVセグメントが見つかるかを決定することに基づく。そのような方法およびベクターを使って合成Vセグメントレパトリーの作製を容易にすることもできる。

重鎖Vセグメントを同定するためおよび合成Vセグメントレパトリーを作製するためのこの方策の概要は、図5と6に描写される。該方策は、適当な変更を伴って、軽鎖Vセグメントを同定するためにも同様に利用することができる。第一段階はクローニングベクターの作製である。好ましい出発材料は、再配列されていないVセグメントと一緒に5' および3' 隣接配列を含有するDNA断片 (約2 kb) である。この断片を、プラスミド、例えば図5および6中で "w" および "z" と指定された稀少な切断制限部位によって隣接されたポリリンカー部位を含むpGP1またはpGP2 (後述) 中にクローニングする (pGP1およびpGP2のポリリンカーと制限部位は実施例において説明する)。次いでオリゴヌクレオチド指令突然変異誘発

を使って、2つの新規制限部位“x”および“y”（通常は各々約6ヌクレオチドの長さ）を導入する。制限部位“x”は、シグナルとVセグメントエクソンとの間のイントロンの3'末端から約20ヌクレオチドの所に置かれる。制限部位“y”は、ヘプタマーとノナマー組換えシグナル配列との間の23 bpのスペーサーの内部に、Vセグメント結合点の約20ヌクレオチド3'側に置かれる。生じたプラスミドを酵素“x”および“y”で切断することにより、第二エクソン（Vセグメント）を除去し、5'隣接配列、V領域プロモーター、シグナルペプチドエクソン、イントロン、“x”末端と“y”末端により隣接されたギャップ、組換えシグナル配列の外側半分、および3'隣接配列を残す。このプラスミドをpVH1と命名する。

第二段階は、4組のオリゴヌクレオチドプライマー（P1～P4）の合成である。P1とP2は約50ヌクレオチドを有する非ユニークオリゴマーであり、その各々は二本鎖cDNA合成を開始させるために使う。P1は、pVH1中の組換えシグナル配列のアンチセンス鎖に相同な配列の約20ヌクレオチドで始まり（5'から3'方向）（制限酵素“y”の認識配列を含む）、そしてVHフレームワーク領域3（FR3）の最後の30ヌクレオチドとハイブリダイズするアンチセンス配列の約30ヌクレオチドが続く。最後の約30ヌクレオチドに渡り、異なるVHファミリーの全てとハイブリダイズする1組のプライマーを生じるように任意塩基が組み込まれる。第二のオリゴヌクレオチドP2は、センス方向にあり、そしてpVH1中の制限部位“x”で始まる約50ヌクレオチドと相同である。これは“x”制限部位、イントロンの最後の約20ヌクレオチド、およびFR1の最後の約30ヌクレオチドを含む。また、最初の30ヌクレオチド付近は、異なるVH領域セグメントに適応するように非ユニークである。オリゴヌクレオチドP3およびP4は、それぞれP1およびP4の最初の約20ヌクレオチドに相同であ

る。それらのオリゴ体はVセグメント中への新規突然変異の導入を回避するためにユニークであり、そしてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって二本鎖cDNAを増幅するのに使われる。

重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の可変セグメントにハイブリダイズすることができ且つ該セグメントの合成を開始することができるプライマーP1およびP2の3'末端部分は、当業者によって容易に決定することができる。例えば、多数のヒトVH遺伝子のヌクレオチド配列が発表されている。例えば、Berman, J.E.ら(1987), EMBO J., 7, 727-738 および Kabat, E.A.ら(1987), Sequences of Protein of Immunological Interest, U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C.を参照のこと。同様に、ヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子座のVセグメントを同定および/または作製するのに使う時、プライマーP1およびP2の3'末端部分は、発表された配列から容易に決定することができる。例えば、Kabat, E.A.ら（前掲）を参照のこと。一般に、様々なVセグメント間で保存されるヌクレオチド部分は、P1およびP2プライマーの3'部分においても保存される。可変セグメントの中で変形が観察されるようなそれらのヌクレオチド部分については、対応するP1およびP2プライマー中のそのようなヌクレオチド部分を同様に変形して、異なるVHまたはVLセグメントにハイブリダイズすることができるプライマーのプールを含んで成るP1およびP2プライマーを提供する。

次の段階は、それらのオリゴヌクレオチドプライマーを使って、ベクターpVH1中でヒト重鎖V領域cDNA配列のライブラリーを作製することである。P1は、ヒトB細胞ポリA⁺RNAからの第一鎖cDNA合成を開始させるために使う。該RNAを塩基加水分解し、そしてP2を使って第二鎖の合成を開始させる。次いで全長の二本鎖cDNAをアクリルアミドゲル上で精製し、電気泳動せしめ、そしてオリゴヌクレ

オチドプライマーP3およびP4を使うポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅のための鑄型として使用する。あるいは、常法によってまずcDNAを合成し、このcDNAをP1開始リアクターのための鑄型として使用する。次いで増幅された生成物（約0.3 kb）をゲル精製し、制限酵素“x”および“y”で切断し、そしてpVH1中にクローニングする。

生成したcDNAライブラリーは、可変領域セグメントの合成ゲノムライブラリーを造し、可変セグメントの従来のゲノムライブラリーを上回る3つの利点を提供する。第一に、従来のライブラリーは50%まで偽遺伝子配列を含んでいるが、このライブラリーは偽遺伝子を全く含まない。第二に、合成ライブラリーは、従来のライブラリーよりもずっとコンパクトであり、20 kbあたり1個の機能的セグメントに対比して、2 kbのDNAあたり1個の機能的V遺伝子を含む。最後に、このアプローチは操作に利用可能であるVセグメントプロモーター配列を残す。

そのようなcDNAライブラリーは、差別的発現のために特定の生殖細胞型Vセグメントの方に偏り得る。偏りの2つの源は(i) Vセグメント組換えの差別的な速度、および(ii) Vセグメントを発現するB細胞クローンの差別的な選択である。第一の偏り源は2つの方法で処理される。第一に、偏りは胎児性免疫グロブリンレパートリーにおいて最も顕著であるため、B細胞RNAの源として胎児性組織を避ける。第二に、半ランダムプライマーP1およびP2を、各々が異なるVセグメントファミリーと選択的に交差ハイブリダイズするプールに分ける。次いでそれらのプライマーを使って4～6つの別個のライブラリーを作製し、こうしてV領域ファミリーの全てが提示されることを保証する。第二の偏り源であるB細胞クローンの差別的選択もまた、同様な2つの方法で処理される。第一に、最小の割合の抗

原選択B細胞を含むRNA源を使用する。リンパ節と脾臓を避ける。成体の骨髓は未選択B細胞の1つの源である。しかしながら、それは前B細胞由来の転写される偽遺伝子配列を高い割合で含む。RNAの別の源は全血である。循環しているB細胞の90%が未成熟の μ または μ , δ を発現している細胞であり、そして最近の骨髓移植物である。しかしながら、抗原選択されたIgG発現細胞のレベルは、個体の免疫状態に大きく依存する。従って、単離されたポリA⁺RNAを、特異的プローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションにより、特定のB細胞配列について調べる。脾RNAを使うことがより実用的である場合、およびこのRNAが高い比率のIgG配列を含む場合、選択の偏りを最少にするために第二のアプローチが使われる。cDNAの第一鎖合成を、IgM転写物に特異的な約40ヌクレオチドの定常領域エクソン2プライマーにより開始させる。次いでP2を用いて第二鎖合成を開始し、そしてP1を用いて第三巡目の合成を開始する。この第三巡目の合成からのcDNAは、P3とP4を使ったPCR増幅のための鑄型を提供する。

可変領域ライブラリーが作製されれば、その中に使われたVセグメントを、標準技術により、例えばファミリー特異的もしくはセグメント特異的オリゴヌクレオチドを用いた配列決定および/またはハイブリダイゼーション並びにPCR法による差別的増幅により、同定することができる。そのようなVセグメントライブラリーの特長付けは、特定の生物におけるVセグメントの使用頻度および分布に関する情報を提供し、結果として、本発明の種々のトランスジェンの作製に使うことのできるVセグメントの同定を提供する。かくして、上述の小遺伝子座トランスジェン構成物において1または複数の有力V遺伝子セグメントを使うことができる。更に、そのようなライブラリーから選択したクローンを使って、頻繁に使われるV

セグメントを含むゲノム断片を同定し、特定の所望のVセグメントを含むゲノム断片の同定を容易にすることができる。

加えて、合成Vセグメントレパートリーは、ライブラリー配列の連結によって作製することができる。注入配列の数百コピーを含む大きな反復性トランスジェン縦列配列は、一般にトランスジェニックマウスの製造の際に作製される。それらの縦列配列は通常非常に安定である。しかしながら、合成V領域の安定性を臨実にするために、好ましくは各々の2 kbのV領域セグメント間にランダムDNAブロックが導入される。それらのランダムDNAブロックは、優性調節要素の挿入を防ぐように、ゲノムDNAを消化し次いで再連結することにより調整される。ゲノムDNAは、好ましくは4種の頻繁な切断制限酵素: AluI, DpnI, HaeIIIおよびRsaIで消化される。この消化は平均長さ64ヌクレオチドを有する平滑末端断片を生成する。50~100ヌクレオチドのサイズ範囲の断片をアクリルアミドゲルから溶出せしめ、次いで再連結する。再連結されたDNAをWboIで部分消化し、サイズ分画する。0.5~2 kbの範囲内の断片を、pVH1の作製に使ったベクターのポリリンカーの BamHIまたはBglII部位中にクローニングする。

ランダム配列ライブラリーを合成Vセグメントライブラリーと組み合わせる合成Vセグメントレパートリーを造成する。ランダム配列ライブラリーからの挿入断片を酵素"w"および"z"で遊離せしめ、ベクター配列から分離精製する。合成Vセグメントライブラリーからの挿入断片を酵素"w"および"z"での消化により単離する。Vセグメント挿入断片を精製する前に、このDNAを子ウシ腸ホスファターゼで処理して自己連結を防止する。次いでVセグメント挿入断片をランダム挿入断片と一緒に連結せしめ、合成Vセグメントレパートリーを含む交互縦列配列を作製する。この連結混合物

をジョー格勾配上でサイズ選別し、50~100 kb分画を、例えばD-J一定常小遺伝子座構成物と一緒に、マイクロインジェクションする。介在するクローニング段階を伴わずに合成Vセグメントレパートリーを直接注入することにより、注入断片の縦列配列が単一部位に挿入されるようになるという事実を利用することが可能である。この場合、そのような縦列配列は完全には余分でないが、更なる多様性をもたらす。あるいは、合成VセグメントレパートリーをD-J-C小遺伝子座と組み合わせて重鎖トランスジェンを形成せしめることもできる。

合成軽鎖免疫グロブリンセグメントレパートリーも同様に、適当な軽鎖遺伝子座用のプライマーを使って作製することができる。

内因性免疫グロブリン遺伝子鎖の機能的破壊

好結果に再配列された免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンの発現は、トランスジェニック非ヒト動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子の再配列を抑制することにより優性作用を有すると予想される。しかしながら、内因性抗体を欠く非ヒト動物を生成せしめる別の方法は、内因性免疫グロブリン遺伝子座を突然変異せしめることによるものである。胎児性幹細胞技術および相同組換えを使って、内因性免疫グロブリンレパートリーを容易に排除することができる。下記はマウス免疫グロブリン遺伝子座の機能的破壊を説明する。しかしながら、開示されるベクターおよび方法は、他の非ヒト動物における使用に合わせて容易に改変することができる。

簡単に言えば、この技術は、生殖細胞組織に分化することができる多分化能性細胞系における、相同組換えによる遺伝子の不活性化を包含する。マウス免疫グロブリンの更なるコピーを含むDNA構成物を胎児性幹細胞の核に導入する。その細胞の一部において、導入さ

れたDNAがマウス遺伝子の内因性コピーと組み換わり、それを更なるコピーで置き換える。新たに操作された遺伝的損傷を含む細胞を宿主マウス胚に注入し、それを受容体の雌に再移植する。それらの胚の一部が変異細胞系に完全に由来する生殖細胞を有するキメラマウスに発達する。従って、キメラマウスを交配することにより、導入された遺伝的損傷を含むマウスの新規系列を獲得することが可能である (Capecchi (1989) *Science*, 244, 1288-1292により概説されている)。

マウス λ 遺伝子座は免疫グロブリンのわずかに5%に寄与するため、重鎖および/または κ 軽鎖遺伝子座の不活性化で十分である。それらの遺伝子座の各々を破壊するには3つの方法があり、J領域の欠失、J-Cイントロンエンハンサーの欠失、および終結コドンの導入による定常領域コード配列の破壊である。DNA構成物デザインの見地から、最後の方法の選択が最も簡単である。 μ 遺伝子の排除はB細胞の成熟を破壊し、それによっていずれかの機能的重鎖セグメントにクラススイッチすることを防ぐ。それらの遺伝子座を破壊(ノックアウト)する方策を下記に概説する。

マウス μ および κ 遺伝子を破壊するためには、Jaenischおよび共同研究者 (Zijlstraら(1989), *Nature*, 342, 435-438) によりマウス $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子の好結果の破壊に使われたデザインを基にした標的ベクターを用いる。プラスミドpMCIneoからのネオマイシン耐性遺伝子(neo)を標的遺伝子のコード領域中に挿入する。pMCIneo挿入断片はneo発現を指令するのにハイブリッドウィルスプロモーター/エンハンサー配列を使う。このプロモーターは胎児性幹細胞中で活性である。従って、破壊(ノックアウト)構成物の組込みのための選択マーカーとしてneoを使うことができる。ランダム挿入現象に対する陰性選択マーカーとしてHSVチミジキ

ナーゼ(tk)遺伝子を該構成物の末端に付加する (Zijlstraら、前掲)。

重鎖遺伝子座を破壊するための標的ベクターを図7に示す。重鎖遺伝子座を破壊するための第一方策はJ領域の削除である。この領域はマウスではかなり小さく、わずか1.3 kbに及ぶ。遺伝子標的ベクターを作製するために、分泌されるA定常領域エクソンの全部を含む15 kbのKpnI断片をマウスゲノムライブラリーから単離する。1.3 kbのJ領域をpMCIneoからの1.1 kb挿入断片により置き換える。次いで該KpnI断片の5'末端にHSV tk遺伝子を付加する。相同組換えによるこの構成物の正しい組込みは、neo遺伝子によるマウスJ_H領域の置換をもたらすだろう(図7)。neo遺伝子を基にしたプライマーとD領域中のKpnI部位の5'のマウス配列に相同のプライマーとを使って、PCRにより組換え体をスクリーニングする。

あるいは、 μ 遺伝子のコード領域を破壊することにより重鎖遺伝子座を破壊(ノックアウト)する。このアプローチは、上記のアプローチで使ったものと同じ15 kbのKpnI断片を必要とする。pMCIneoからの1.1 kb挿入断片をエクソンII中のユニークBamHI部位のところに挿入し、そしてHSK tk遺伝子を3' KpnI末端に付加する。neo挿入断片の片側における二重交差(これはtk遺伝子を削除する)を選択する。それらは、選択されたクローンのプールからPCR増幅により検出される。PCRプライマーの一方はneo配列に由来し、そして他方は標的ベクターの外側のマウス配列に由来する。マウス免疫グロブリン遺伝子座の機能的破壊は実施例に記載される。

再配列された免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物

再配列されていない小遺伝子座Igトランスジェンを含有する上述のトランスジェニック動物の基礎をなす前提は、天然の免疫グロブリン遺伝子座に見つかる可変遺伝子セグメントの全部を含める必要なしに完全な抗体レパートリーを作製することが可能であることである。理論的には、二次レパートリーを減少させずに、一次レパートリーに貢献する異なる配列の数を減らすことが可能である。任意の特定抗原に対してT細胞依存性応答を開始するのに十分な多様性が一次レパートリーにある限り、体細胞高度突然変異がその抗原に対する高親和性抗体を提供することができるだろう。

この概念は、完全に相同の抗体レパートリーが体細胞突然変異により完全に作製される本発明のこの観点において更に前進する。抗原結合部位は、アミノ末端重鎖ドメインとアミノ末端軽鎖ドメインの間の界面により造られる。抗原と相互作用するそれらの各ドメインの内部のCDR1、2および3残基は、β鎖を連結する3つの異なるループ上に位置する。前に記載したように、それらの領域は、異なる抗原を認識する異なる抗体分子間で最大の配列多様性を有する。よって、抗体レパートリーはCDR1、2および3の配列多様性により決定される。完全な抗体レパートリーを生成するCDR1、2および3の多様性は3つの源に由来する：組換え多様性、結合多様性および体細胞突然変異。CDR1とCDR2のところの組換え多様性は、異なるCDR1および2配列を含む異なるVセグメントの選択から生じる。CDR3のところの組換え多様性は、異なるDおよびJセグメントの選択から生じる。結合多様性はCDR3多様性にのみ貢献し、V領域全体にまたがって作用する体細胞突然変異は、3つの相補性決定領域の全ての多様性に貢献する。組換えおよび結合多様性は一緒になって一次レパートリーの多様性に貢献する(図1)。VDJ結合はIgMを発現する一次B細胞のセットを生じる。

既知抗原に対して低い親和性を有する抗体を形成する。この動物に既知抗原を注入した場合、そのB細胞は二次応答を受け、その抗原に対する高親和性抗体の産生を引き起こす。しかしながら、このマウスに既知抗原と新規抗原の混合物を注入し、次いで新規抗原のみでチャレンジした場合には、上述の分岐過程により、新規抗原に対する高親和性抗体が産生される。このアプローチは次の2つの主な利点を有する：第一に、トランスジェニック構成物が容易に作製できること；そして第二に、再配列されたトランスジェンは、内因性マウス遺伝子の再配列を対立的および同位的に排除でき、よって上述した相同組換えによりそれらの遺伝子を排除する必要がなくなる。

本発明のこの態様の第一段階は、既知抗原に対して向けられたIgM抗体を発現するヒトハイブリドーマからの、再配列された重鎖および軽鎖遺伝子の単離である。理想的ハイブリドーマは、良好なマウスT細胞応答を生ぜしめることができる容易に入手可能な抗原を認識するものである。そのようなヒトハイブリドーマは多数現存し、それらとしては、破傷風毒素、シュードモナス、またはグラム陰性菌といった有望な抗原と反応するものが幾つか挙げられる(JamesおよびBourla (1987) *J. Immunol. Methods*, 100, 5-40により概説されている)。完全な再配列された重鎖遺伝子はDNAの単一断片(約20 kb)上に単離され、一方3'エンハンサーを含む再配列されたκ軽鎖遺伝子は第二のDNA断片(約20 kb)上に単離される。それらの各断片は、ハイブリドーマから単離されたDNAから作製したλファージライブラリーから単離されたクローンから一緒に融合される。2つの構成物、即ち重鎖構成物と軽鎖構成物が作製される。

重鎖構成物(図10)は、ヒトγ3およびγ1定常領域を含む25 kb断片とその後方のラット重鎖3'エンハンサー(Peterssonら

外來抗原に対して最少の親和性を有する細胞表面IgM分子を発現する任意の一次レパートリーB細胞は、IgMとしてその抗原を細胞内に取り込み、そして細胞表面から離れて循環する。次いで抗原は加工され、会合したペプチドがクラスII MHC分子により細胞表面上に提示される。十分な外來抗原が細胞表面に提示されれば、これがT細胞応答を開始させ、次いでT細胞応答がB細胞のT細胞依存性成熟を開始させる。これがいわゆる二次応答である(図8)。この応答の一部は、免疫グロブリン遺伝子の可変領域の高度突然変異に関係する。従って二次応答を受けたB細胞クローンは常に、変更された免疫グロブリン分子を有する新規クローンを生じる。体細胞高度突然変異は全V領域にまたがって起こるため、親和性の成熟の過程に対する理論的制限はない。

本発明のこの観点では、完全な抗体応答を生ぜしめるのにCDR1およびCDR2多様性は不要である。むしろ、VJおよびVDJ結合により作られるCDR3多様性が、多数の異なる抗原に対して高親和性抗体を産生するT細胞依存性成熟を開始させるのに十分な最少の親和性を提供するであろう。よって、一次多様性を用いずに広範囲の抗体レパートリーを作製するための方法およびトランスジェニック動物が提供される。そのような多様性は、抗体多様性の発生のための体細胞突然変異に頼っている。親和性成熟の過程の間に、体細胞突然変異は、刺激抗原に対して高いというよりもむしろ低い親和性を有する多数のクローンを生ぜしめる。それらのクローンの大部分は選択されず、死に絶えてしまう。しかしながら、それらのクローンの1つが更に存在する新規抗原に対して親和力を有するならば、このクローンは増殖して新規抗原に対する親和性成熟を受ける(図9)。本発明のこの観点では、再配列されたヒト重鎖および軽鎖を有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばマウスを組み合わせると、

(1990), *Nature*, 344, 165-168)を含む700 bp断片に連結された、再配列されたIgM遺伝子を含有する20 kbのハイブリドーマ断片から成る。軽鎖構成物は、再配列されたκ鎖と3'エンハンサーとを含む20 kbの完全DNA断片である。それら2つの構成物を、それらがマウスゲノム中の単一部位において組み込まれるように、同時注入する。トランスジェニックマウスをトランスジェンクRNAの発現についてノーザンブロット分析により試験する。次いで尾部血液試料においてFACS分析を実施し、トランスジェンによりコードされるタンパク質の細胞表面発現を検出する。次いでマウスをもとのハイブリドーマにより認識される抗原で免疫処置する。尾部血液試料に関してELISAおよびFACS分析を実施してクラススイッチを検出する。最後に、もとの抗原と一緒に抗原のパネルを同時注入することにより、多数の異なる抗原に応答する能力についてマウスを試験する。尾血液をELISAにより分析し、個々の抗原に対して向けられた高親和性ヒトIgG抗体の産生を検出する。

このトランスジェニックマウスを、特定抗原に対して向けられたヒト抗体の産生に使用するためには、その抗原を、好ましくは遺伝子を単離したハイブリドーマに関連する抗原と一緒に、同時注入する。このハイブリドーマ関連抗原は補抗原(しばしば第二抗原)と呼ばれ、新規抗原は単に抗原(または第一抗原)と呼ばれる。可能であれば、第二抗原は注入前に第一抗原に化学的に架橋結合される。これは、第一抗原を一次トランスジェン提示B細胞により取込みおよび提示させ、それによって第一抗原を認識する活性化ヘルパーT細胞のプールの存在を保証する。典型的な免疫処置スケジュールは次の通りである。第1日：完全フロイントアジュバント中で第二抗原と混合したまたはそれに架橋結合した第一抗原をマウスに腹腔内(ip)注射する。第14日：第一抗原(第二抗原を含まない)を不完全

フロントアジュバント中でip注射する。第35日：不完全フロイントアジュバント中の第一抗原を繰り返し注射する。第45日：尾部血液試料においてELISAにより抗体応答について試験する。第56日：良好な応答者に不完全フロイントアジュバント中の抗原を繰り返し注射する。第59日：良好な応答者の脾臓を融合する。

本発明の別の観点では、Ig遺伝子を単離したハイブリドーマにより認識される抗原を免疫原として使う。次いでもとの抗体の体細胞突然変異形を発見する免疫処置動物から、新規トランスジェニックハイブリドーマを単離する。それらの新規抗体は、もとの抗原に対して一層高い親和性を有するだろう。この抗体「研磨(sharpening)」法は、CDR移植術により作製された(E.P.公開番号239400、1987年9月30日に公開)かまたは細菌(W.D. Huseら(1989) *Science*, 246, 1275)もしくはファージ(T. Clacksonら(1991) *Nature*, 352, 624)を発見ライブラリーから単離された抗体遺伝子にも適用することができる。

再配列されたまたは再配列されていない免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖トランスジェンを含むトランスジェニック非ヒト動物

上記態様は、完全に再配列されたまたは完全に再配列されていない重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンを使って、異種抗体を産生することのできるトランスジェニック非ヒト動物を製造することを記載した。本発明の更なる観点では、上述のいずれかの再配列されていないトランスジェンおよび再配列されたトランスジェンを組み合わせて使用してトランスジェニック動物において重鎖および軽鎖トランスジェンを提供することにより、少なくとも1つの再配列された免疫グロブリントランスジェンと少なくとも1つの再

に配列しそして比較した時に、少なくとも約80%のヌクレオチド、通常は少なくとも約90%~95%、より好ましくは少なくとも約98%~99.5%のヌクレオチドが同一であることを指摘する。あるいは、セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下でその鎖の相補体にハイブリダイズする時、実質的相関性が存在する。核酸は完全細胞中に、細胞溶解物中に、または部分的に精製されたもしくは実質的に純粋な形で、存在することができる。核酸は、標準技術により、例えばアルカリ/SDS処理、CsClバンド沈降、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当業界で公知の他の方法により、他の細胞成分または他の汚染物、例えば他の細胞性核酸もしくはタンパク質から分離精製された時、「単離され」または「実質的に純粋にされ」る。P. Ausubelら編、*Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987)を参照のこと。

本発明の核酸組成物は、遺伝子配列を提供するための標準技術に従って、しばしばcDNA、ゲノムDNAまたは混合物のいずれかからの生来の配列(修飾された制限部位等を除く)を変異せしめることができる。コード配列については、それらの変異は、所望であればアミノ酸配列に影響してもよい。特に生来のV、D、J、定常、スイッチおよび他の本明細書中に記載のそのような配列に実質的に相同であるかまたはそれから誘導されるDNA配列が考えられる(ここで、「誘導される」とは、ある配列が別の配列と同一であるかまたは変更されていることを指摘する)。

核酸はそれが別の核酸配列と機能的関係に置かれる時、「作用可能に連結される」という。例えば、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列の転写に作用するならば、それらはコード配列に作用可能に連結されている。転写調節配列については、作用可能に連

配列されていない免疫グロブリントランスジェンを含むトランスジェニック動物を製造する。この点に関して、再配列されていないトランスジェンは、重鎖または軽鎖のゲノムまたは小遺伝子座トランスジェン構成物を含んで成ることができ、再配列されたトランスジェンは再配列された適当なトランスジェンを含んで成ることができる。例えば、再配列されていない小遺伝子座軽鎖トランスジェンを使う場合、他方の適当なトランスジェンは完全に再配列された重鎖トランスジェンである。しかしながら、再配列されたトランスジェンが再配列された免疫グロブリン軽鎖トランスジェンを含んで成り、そして再配列されていないトランスジェンが免疫グロブリン重鎖ゲノムまたは小遺伝子座トランスジェン、最も好ましくは、関連したAおよび γ 定常領域を有する再配列されていないトランスジェンを含んで成ることが好ましい。

再配列されたトランスジェンと再配列されていないトランスジェンとの組合せは、一次レパトリーB細胞内での多様性の中間レベルを提供する。一次レパトリーB細胞における再配列されたトランスジェン中のCD1、CD2およびCD3の一次多様性は固定されるけれども、再配列されていないトランスジェンの再配列によって生じるCDR1、CDR2およびCDR3の一次多様性は、再配列された重鎖および軽鎖トランスジェンを使った時に得られるB細胞クローンよりも高い潜在的多様性を有するB細胞の一次レパトリーの集団を提供する。そのような一次多様性は、そのような細胞が外来抗原に应答すると、体細胞突然変異によって拡大された二次多様性を提供する。

核酸

用語「実質的に相同な」核酸とは、2つの核酸が、または指定されたその配列が、適当なヌクレオチド挿入または欠失を使って最適

結されるとは、連結されるDNA配列が連続であって、そして2種のタンパク質コード領域を連結することが必要な場合には、連続であって且つ読み枠内であることを意味する。スイッチ配列については、作用可能に連結されるとは、該配列がスイッチ組換えを行うことができることを意味する。

特定の好ましい態様

本発明の好ましい態様は、実施例16に記載のトランスジェンの単一コピーを含む動物と交配させた実施例14に記載のトランスジェン(pHC2)の単一コピーを含む動物、並びに実施例9および12に記載のJH欠失動物から繁殖させた子孫である。動物はそれらの3つの特性について同型接合に交配される。そのような動物は次の遺伝子型を有する：再配列されていないヒト重鎖小遺伝子座(実施例14に記載)の単一コピー(染色体の一倍体1組あたり)、再配列されたヒト κ 軽鎖構成物(実施例16に記載)の単一コピー(染色体の一倍体1組あたり)、および機能的JHセグメントの全部を除去する各内因性マウス重鎖遺伝子座のところの欠失(実施例9および16に記載)。そのような動物は、JHセグメントの欠失について同型接合であるマウスと交配させると、JH欠失について同型接合でありそしてヒト重鎖および軽鎖構成物については半接合である子孫を生産する。生じた動物に抗原を注入し、それらの抗原に対するヒトモノクローナル抗体の産生に使う。

そのような動物から単離されたB細胞は、それらが各遺伝子の単一コピーのみを含むため、ヒト重鎖および軽鎖に関して単一特異性である。更に、それらはヒトまたはマウス重鎖に関して単一特異性であろう。というのは、実施例9および12に記載のようにして導入されたJH領域に広がる欠失によって、両方の内因性マウス重鎖遺

伝子コピーが非随機的であるためである。更に、B細胞の実質的部分はヒトまたはマウス胚縁に関して単一特異性であろう。何故なら、再配列されたヒトκ胚縁遺伝子の単一コピーの発現が、B細胞の実質的部分における内因性マウスκおよびλ胚縁遺伝子の再配列を対立的におよび同位的に排除するだろうからである。

好ましい態様のトランスジェニックマウスは、理想的には生来のマウスのものと実質的に同じである、有意なレパトリーを有する免疫グロブリン産生を示すだろう。例えば、内因性Ig遺伝子が不活性化されている時、総免疫グロブリンレベルは約0.1~10mg/ml血清、好ましくは0.5~5 mg/ml、理想的には少なくとも約1.0 mg/mlの範囲であろう。IgMからIgGにスイッチすることができるトランスジェニックをトランスジェニックマウスに導入した時、血清IgG対IgMの成熟マウス比は好ましくは約10:1である。もちろん、IgG対IgM比は、未成熟マウスではずっと低いだろう。一般に、脾臓およびリンパ節B細胞の約10%より多く、好ましくは40~80%が、もっぱらヒトIgGタンパク質のみを発現する。

レパトリーは理想的には非トランスジェニックマウス中にしめされるものとほぼ等しく、通常は少なくとも約10%ほど高く、好ましくは25~50%またはそれ以上高いだろう。マウスゲノム中に導入される異なるV、JおよびD領域の数に主として依存して、通常少なくとも約1000種の異なる免疫グロブリン（理想的にはIgG）、好ましくは $10^4 \sim 10^5$ またはそれ以上の免疫グロブリンが産生されるだろう。それらの免疫グロブリンは、典型的には、高抗原性タンパク質の約半分またはそれ以上を認識するだろう。抗原性タンパク質としては、ハトチトクロームC、ニワトリリゾチーム、アメリカヤマゴボウのマイトジェン(PWM)、ウシ血清アルブミン、アオガイヘモシアニン、インフルエンザ赤血球凝集素、スタフィロコッカスバ

ロティンA、マッコウクシラミオグロビン、インフルエンザノイラミニダーゼおよびリブレサータンパク質が挙げられるがそれに限定されない。上記免疫グロブリンの幾つかは、予め選択された抗原に対して、少なくとも約 $10^{-4}M^{-1}$ 、好ましくは $10^{-3}M^{-1} \sim 10^{-5}M^{-1}$ またはそれ以上の親和性を示すだろう。

上記に本発明のトランスジェニック動物の好ましい態様を記載したけれども、他の態様は本明細書の開示により、そしてより特定のには実施例に記載のトランスジェニックにより定義される。トランスジェニック動物の4つのカテゴリーが定義され得る：

- I. 再配列されていない重鎖免疫グロブリントランスジェニックと再配列された軽鎖免疫グロブリントランスジェニックとを含有するトランスジェニック動物。
- II. 再配列されていない重鎖免疫グロブリントランスジェニックと再配列されていない軽鎖免疫グロブリントランスジェニックとを含有するトランスジェニック動物。
- III. 再配列された重鎖免疫グロブリントランスジェニックと再配列されていない軽鎖免疫グロブリントランスジェニックとを含有するトランスジェニック動物。
- IV. 再配列された重鎖免疫グロブリントランスジェニックと再配列された軽鎖免疫グロブリントランスジェニックとを含有するトランスジェニック動物。

トランスジェニック動物の上記カテゴリーの、好ましい優先順序はI>II>III>IVである。

トランスジェニック動物の上記カテゴリーの各々の範囲内で、多数の可能な組合せが好ましい。そのような好ましい態様は下記のものを含んで成る。

カテゴリー I

(a)実施例7または16の動物と交配させた実施例1と2または19と20の動物。

(b)実施例7または16の断片と同時注入した実施例1または19の断片。

(c)実施例7または16の動物と交配させた実施例5(H、IまたはJ)、14、17または21の動物。

(d)実施例7または16の構成物と同時注入した実施例5(H)または14の構成物。

(e)実施例9、11、12または13の動物と交配させた上記の全て。特に好ましい態様は実施例9または12または13の動物と交配させた上記の全てである。

カテゴリー II

(a)実施例6、3、4、16、22または23の動物と交配させた実施例1、2、19または20の動物。

(b)実施例2または20に記載の断片と同時注入した実施例1または19に記載の断片。

(c)実施例6(B、CまたはD)または16の動物と交配させた実施例5(H、IまたはJ)、14、17または21の動物。

(d)構成物6(B)または16と同時注入した構成物5(H)または14。

(e)実施例6(B、CまたはD)または16の動物と交配させた実施例1、2、19または20の動物。

(f)実施例5(H、IまたはJ)、14、17または21の動物と交配させた実施例3、4、22または23の動物。

(g)実施例9、10、11、12または13の動物と交配させた上記の全て。

カテゴリー III

(a)実施例8または15の動物と交配させた実施例3、4、22または23の動物。

(b)実施例8または15の断片と同時注入した実施例3または23の断片。

(c)実施例8または15の動物と交配させた実施例6(B、CまたはD)または16の動物。

(d)実施例8または15の構成物と同時注入した実施例6(B)または15の構成物。

(e)実施例9~13の動物と交配させた上記の全て。

カテゴリー IV

(a)実施例8または15の動物と交配させた実施例7または16の動物。

(b)実施例8または15の構成物と同時注入した実施例7または16の構成物。

(c)実施例9~13の動物と交配させた上記の全て。

下記は例示のつもりで与えられ、請求の範囲に対する限定と解釈してはならない。

方法および材料

トランスジェニックマウスは、Hoganら、"Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratoryに従って誘導される。

胎児性幹細胞は、発表された方法に従って操作される(Terato-carcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, E. J. Robertson編, IRL Press, Washington, D.C., 1987 ;

Zijlstraら(1989), Nature, 342, 435-438; およびSchwartzberg,

P.ら(1989). Science, 246, 799-803)。

DNAクローニング方法は、J. Sambrook ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に従って実施される。

オリゴヌクレオチドは、製造業者により与えられた規格書に従ってApplied Biosystemsのオリゴヌクレオチド合成装置上で合成される。

ハイブリドーマ細胞および抗体は、"Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow およびDavid Lane編, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)に従って操作される。

実施例1

ゲノム重複ヒトIgトランスジェン

この実施例は、マウスの接合子中にマイクロインジェクトされるヒトゲノム重複免疫グロブリントランスジェンのクローニングとマイクロインジェクションを記載する。

Marzluff, W.F.ら(1985), "Transcription and Translation: A Practical Approach", B.D. HammesおよびS.J. Higgins編, 89-129頁, IRL Press, Oxfordにより記載されたようにして、新鮮なヒト胎盤組織から核を単離する。単離された核(またはPBSで洗浄したヒト精母細胞)を低融点アガロース母材中に埋め込み、EDTAとプロテイナーゼKで溶解せしめて高分子量DNAを暴露させ、このDNAを次いでM. FinneyによりCurrent Protocols in Molecular Biology (F. Ausubelら編, John Wiley & Sons, 増補4版, 1988, 第2.5.1章)中に記載された通りにアガロース中で制限酵素Not Iで消化する。

次いでNot I消化DNAを、Anand, R.ら(1989), Nucl. Acids Res.,

記載されたようにV1〜V5の複数コピーを含む上述の670-830 kb Not I断片の上流の570 kb Not I断片を単離する。(Bermanら(1988)前掲は2つの570 kb Not I断片を検出した。その各々が多数のVセグメントを含む。)

上記2断片を実施例1に記載の如くマウス単細胞胚の核に同時注入する。

2つの異なるDNA断片の同時注入は、通常、染色体内の同じ挿入部位のところへの両断片の相込みを引き起こすだろう。従って、2断片の各々の少なくとも1コピーを含有する生成トランスジェニック動物の約50%が、定常領域含有断片の上流に挿入されたVセグメントを有するだろう。それらの動物のうち、110 kb Spe I断片の位置に関する570 kb Not I断片の方向に依存して、50%がDNA逆位により、そして50%が欠失により、V-DJ結合を達成するだろう。生成したトランスジェニック動物からDNAを単離し、そしてサザンブロットハイブリダイゼーションにより両トランスジェンを含むことがわかったそれらの動物(詳しくは、多数のヒトVセグメントとヒト定常領域遺伝子の両方を含む動物)を、ヒト免疫グロブリン分子を発現する能力について試験する。

実施例3

生体内相同組換えにより形成される

ゲノム重複ヒトIgトランスジェン

ヒトκ軽鎖の地図はLorez, W.ら(1987), Nucl. Acids Res., 15, 9667-9677に記載されており、そして図11に描写される。

Cκ全部、3'エンハンサー、全Jセグメントおよび少なくとも5つの異なるVセグメントを含有する450 kb Xho I - Not I断片(a)を単離し、そして実施例1に記載の如く単細胞胚の核にマイ

17, 3425-3433により記載されたようにバルスフィールドゲル電気泳動により分画する。Not I断片に富む画分をサザンブロットハイブリダイゼーションによりアッセイし、この断片によりコードされる1または複数の配列を検出する。そのような配列は、重複Dセグメント、Jセグメント、μおよびγ1定常領域と一緒に6種のVHファミリーの全部の代表物を含む(この断片は、Bermanら(1988)前掲によりHeLa細胞から670 kb断片として同定されているが、本発明者らはヒト胎盤および精子DNAからは830 kb断片としてであることを発見した)。このNot I断片を含む画分(図4参照)をプールし、そして酵母細胞中のベクターpYACNNのNot I部位にクローニングする。プラスミドpYACNNは、pYAC-4 Neo (Cook, H.ら(1988), Nucl. Acids Res., 16, 11817)をEcoRIで消化しそしてオリゴヌクレオチド5'-AAT TGC GGC CGC -3'の存在下で連結せしめることにより調製する。

Brownsteinら(1989), Science, 244, 1348-1351およびGreen, E.ら(1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1213-1217により記載されたようにして、重複Not I断片を含むYACクローンを単離する。M. Finney前掲により記載されたバルスフィールドゲル電気泳動により、高分子量酵母DNAからクローニング Not I挿入断片を単離する。1 mMのスペルミンの添加によりこのDNAを凝縮させ、上述の単細胞胚の核に直接マイクロインジェクトする。

実施例2

不連続ゲノム重複Igトランスジェン

VH6、Dセグメント、Jセグメント、μ定常領域および一部のγ定常領域を含むヒトゲノムDNAの110 kb Spe I断片(図4参照)を実施例1に記載の如くYACクローニングにより単離する。

クローニングする。

実施例4

生体内相同組換えにより形成される

ゲノム重複ヒトIgトランスジェン

上記成分の全部と少なくとも20個多いVセグメントとを含む750 kb Mlu I - Not I断片(b)(図11参照)を実施例1に記載の如く単離し、そしてBssH IIで消化して約400 kbの断片(c)を生成せしめる。

450 kb Xho I - Not I断片(a)と約400 kb Mlu I - BssH II断片(c)は、図11に示されるBssH II制限部位とXho I制限部位とにより限定される配列重複を有する。マウス接合子のマイクロインジェクションによるそれらの2断片の相同組換えは、450 kb Xho I / Not I断片(実施例3)中に見つかるものよりも少なくとも15〜20個追加のVセグメントを含むトランスジェンをもたらす。

実施例5

重複小遺伝子座の作製

A. pGP1およびpGP2の作製

pBR322をEcoRIとStyIで消化し、下記のオリゴヌクレオチドと連結せしめることにより、図13に記載の制限部位を有する147塩基対の挿入断片を含むpGP1を作製する。それらのオリゴの概略的重复は図13にも示される。

オリゴヌクレオチドは下記のものである：

オリゴ-1 5' - CTT GAG CCC GCC TAA TGA GCG GCG TTT
TTT TTG CAT ACT GCG GCC - 3'

オリゴ-2 5' - GCA ATG GCC TGG ATC CAT GCG GCG CTA
GCA TCG ATA TCT AGA GCT CGA GCA - 3'

オリゴ-3 5' - TGC AGA TCT GAA TTC CCG GGT ACC AAG
 CTT ACG CGT ACT AGT GCG GCC GCT - 3'

オリゴ-4 5' - AAT TAG CCG CCG CAC TAG TAC CCG TAA
 GCT TGG TAC CCG GGA ATT - 3'

オリゴ-5 5' - CAG ATC TGC ATG CTC GAG CTC TAG ATA
 TCG ATG CTA GCG CGC CAT GGA TCC - 3'

オリゴ-6 5' - AGG CCA TTG CCG CCG CAG TAT GCA AAA
 AAA AGC CCG CTC ATT AGG CCG GCT - 3'

このプラスミドは、マイクロインジェクション用のベクター配列から単離することができる大挿入断片を構築するための、稀少な切断性Not I 部位により隣接された大きなポリリンカーを含む。このプラスミドは、pUC 由来プラスミドに比べて比較的低コピーであるpBR322に由来する（pGP1は複製開始点の近くにpBR322コピー数調節領域を保持している）。低コピー数は挿入配列の潜在的毒性を減少させる。加えて、pGP1は、アンピシリン耐性遺伝子と前記ポリリンカーとの間に挿入された、trpA由来の強力な転写ターミネーター配列【Christie, G.E.ら(1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*】も含む。これは、アンピシリンプロモーターから起こる読み越し転写を防ぐことにより、或る種の挿入断片に関係する毒性を減少させる。

プラスミドPG2 は、ポリリンカー中に追加の制限部位（Sfi I）を導入するようにpGP1から誘導される。pGP1をMlu IとSpe Iで消化し、該プラスミドのポリリンカー部分の中の認識配列を切除する。

このように消化されたpGP1に次のアダプターオリゴヌクレオチドを連結せしめてpGP2を作製する。

5' CGC GTG GCC GCA ATG GCC A 3'

5' CTA GTG GCC ATT GCG GCC A 3'

pGP2はMlu I 部位とSpe I 部位の間に置かれた追加のSfi I 部位を含むこと以外はpGP1と同じである。これは挿入断片をSfi I で並びにNot I で完全に切除することを可能にする。

CCT CTT CCT CCT を使ってヒトゲノムDNAライブラリーから単離された4 kb EcoRI/Hind III断片（図14）を使って隣接の3' 1.5 kb BamHI 断片を同様に単離し、そしてpUC19 中にクローニングする。

pGP1をBamHI とBgl IIで消化した後、子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理する。

図14からの断片(a)および(b)を前記消化pGP1中にクローニングする。次いで5' BamHI 部位がBamHI /Bgl II融合により破壊されるように置かれたクローンを単離する。それをpMU と命名する（図15参照）。pMU をBamHI で消化し、図14からの断片(c)を挿入する。Hind III消化により方向性を確認する。生じたプラスミドpHIG1（図15）は、J およびC μ セグメントをコードする18 kb 挿入断片を含む。

D. C μ 領域のクローニング

pGP1をBamHI とHind IIIで消化し、次いで子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理する（図14）。このように処理された図14の断片(b)および図14の(c)を、BamHI /Hind IIIで切断したpGP1中にクローニングする。Hind III消化により断片(c)の正しい方向を確認し、C μ 領域をコードする12 kb 挿入断片を含むpCON1 を得る。

pHIG1 は、Not I 部位により隣接されたポリリンカー中にSfi I 3' 部位とSpe I 5' 部位を有する18 kb 挿入断片内にJセグメント、スイッチおよび μ 配列を含む故に、再配列されたVDJセグメントに使われるだろう。pCON1 はJ領域を欠き12 kb 挿入断片のみを含むこと以外はpHIG1 と同じである。再配列されたVDJセグメントを含む断片の作製におけるpCON1 の使用については後に記載する。

E. γ -1 定常領域のクローニング (pREG2)

ヒト γ -1 領域のクローニングは図16に描写される。

Yamamuraら(1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2152-2156

B. pRE3 (ラットエンハンサー3') の作製

ラット定常領域の下流に置かれたエンハンサー配列を重複構成物中に導入する。

Petterssonら(1990), *Nature*, 344, 165-168により記載された重複領域3' エンハンサーを単離し、クローニングする。次のオリゴヌクレオチド:

5' CAG GAT CCA GAT ATC AGT ACC TGA AAC AGG GCT TCC 3'

5' GAG CAT GCA CAG GAC CTG GAG CAC ACA CAG CCT TCC 3'

を使って、ラットIGH 3' エンハンサー配列をPCR増幅せしめる。

こうして形成された3' エンハンサーをコードする二本鎖DNAをBamHI とSphIで切断し、BamHI/SphIで切断されたpGP2中にクローニングしてpRE3 (ラットエンハンサー3') を得る。

C. ヒトJ- μ 領域のクローニング

この領域の実質的部分を、 λ ファージ挿入断片から単離された2以上の断片を組み合わせるによりクローニングする。図14を参照のこと。

オリゴヌクレオチド GGA CTG TGT CCC TGT GTG ATG CTT TTG ATG TCT GCG GCC AAGを使って、全部のヒトJセグメントを含む6.3 kb BamHI/Hind III断片【Matsuda ら(1988), *EMBO J.*, 7, 1047-1051; Ravetchら(1981), *Cell*, 27, 583-591】をヒトゲノムDNAライブラリーから単離する。

オリゴヌクレオチド CAC CAA GTT GAC CTG CCT GGT CAC AGA CCT GAC CAC CTA TGA を使って、エンハンサー、スイッチおよび定常領域コードエクソンを含む隣接の10 kb Hind III/BamHI 断片【Yasui ら(1989), *Eur. J. Immunol.*, 19, 1399-1403】を同様に単離する。

プローブとしてクローンpMUM挿入断片（pMUMは、 μ 遺伝子エクソン1オリゴヌクレオチド: CCT GTG GAC CAC CGC CTC CAC CTT CAT CGT

は、組込み時に部分的に削除されたトランスジェン構成物からの膜結合ヒト γ -1の発現を報告している。彼らの結果は、3' BamHI 部位が、5 kb未満のV-Cイントロンを有する経膜再配列されそしてスイッチされた γ 遺伝子コピーを含む配列の輪郭となることを指摘している。従って、再配列されていないスイッチされていない遺伝子では、最初の γ -1定常エクソンの5' 末端から5 kb未満のところで始まる配列中にスイッチ領域全体が含まれる。従ってそれは5' 5.3 kb Hind III断片中に含まれる【Ellison, J.W. ら(1982), *Nucleic Acids Res.*, 10, 4071-4079】。Takahashi ら(1982), *Cell*, 29, 671-679 もまた、この断片がスイッチ配列を含むことを報告しており、この断片と7.7 kb Hind III-BamHI 断片とを合わせると我々がトランスジェン構成物に必要とする配列の全部を含むに違いない。

γ -1 の第三エクソン (CH3) に特異的である次のオリゴヌクレオチドを使って、 γ -1 領域を含むファージクローンを同定し単離する。

5' TGA GCC ACG AAG ACC CTG AGG

TCA ACT TCA ACT GGT ACG TGG 3'

7.7 kb Hind III-Bgl II断片（図16中の断片(a)）をHind III/Bgl IIで切断されたpRE3中にクローニングしてpREG1 を作製する。上流の5.3 kb Hind III断片（図16中の断片(b)）をHind III消化pREG1 中にクローニングしてpREG2 を作製する。BamHI/Spe I 消化により正しい方向を確認する。

F. C γ とC μ の結合

上述したプラスミドpHIG1 はヒトJセグメントとC μ 定常領域エクソンを含む。C μ 定常領域遺伝子セグメントを含むトランスジェンを提供するために、pHIG1 をSfi I で消化した（図15）。プラス

ミドpREG2もSfiIで消化し、ヒトC α エクソンとラット3'エンハンサー配列を含む13.5 kb 挿入断片を得た。それらの配列を連結し、31.5 kb 挿入断片上にヒトJセグメント、ヒトC μ 定常領域、ヒトC γ 1定常領域およびラット3'エンハンサー配列を含むプラスミドpHIG3'を作製した(図17)。

pCON1をSfiIで消化し、そしてpREG2をSfiIで消化して得られたヒトC α 領域とラット3'エンハンサーとを含むSfiI断片と連結せしめることにより、ヒトC μ およびヒトC γ 1をコードするがJセグメントを含まない第二のプラスミドを作製する。得られたプラスミドpCON(図17)は、ヒトC μ 、ヒトC γ 1およびラット3'エンハンサー配列を有する26 kbのNotI/SpeI挿入断片を含有する。

G. Dセグメントのクローニング

ヒトDセグメントをクローニングするための方策は図18に描写される。Dセグメントを含むヒトゲノムライブラリーからのファージクローンを、多様性領域配列(Y. Ichiharaら(1988), *EMBO J.*, 7, 4141-4150)に特異的なプローブを使って同定しそして単離する。次のオリゴヌクレオチドを使用する。

```
DXP1: 5' - TGG TAT TAC TAT GGT GGG AGT TAT TAT
      AAC CAC AGT GTC - 3'

DXP4: 5' - GCC TGA AAT GGA GCC TCA GGG CAC AGT GGG
      CAC GGA CAC GGT - 3'

DN4: 5' - GCA GGG AGG ACA TGT TTA GGA TCT GAG GCC
      GCA CCT GAC ACC - 3'
```

オリゴ DXP1 を使って同定されたファージクローンから、DLR1, DXP1, DXP'1 およびDA1を含む5.2 kb XhoI断片(図18中の断片(b))を単離する。

オリゴ DXP4 を使って同定されたファージクローンから、DXR4,

と3'および5'隣接配列と一緒に再配列されていないVセグメントを含む約2 kbの長さを有するDNA断片を提供するユニーク制限部位を同定する。5'開始配列はプロモーターおよび他の調節配列を含み、一方3'隣接配列はV-DJ結合に必要な組換え配列を提供するだろう。この約3.0 kbVセグメント挿入断片をpGB2のポリリンカー中にクローニングし、pVH1を形成せしめる。

pVH1をSfiIで消化し、得られた断片をpHIG2のSfiI部位にクローニングしてpHIG5'を作製する。pHIG2はDセグメントのみを含むので、生成したpHIG5'プラスミドはDセグメントと一緒に単一のVセグメントを含む。pHIG5'中に含まれる挿入断片のサイズは、10.6 kb + Vセグメント挿入断片のサイズである。

NotIとSpeIで消化によりpHIG5'から挿入断片を切り出す。J, C μ およびC γ 1セグメントを含むpHIG3'をSpeIとNotIで消化し、そして上記配列とラット3'エンハンサーとを含む3 kb断片を単離する。それらの2断片を一緒にして、NotIで消化されたpGP1中に連結せしめ、Vセグメント、9つのDセグメント、6つの機能的なJセグメント、C μ 、C γ 1およびラット3'エンハンサーを含むpHIGを作製する。この挿入断片のサイズは約43 kb + Vセグメント挿入断片のサイズである。

I. 相同組換えによる重鎖小遺伝子座の作製

前章で指摘したように、pHIGの挿入断片は単一のVセグメントを使用すると約43~45 kbである。この挿入断片サイズは、プラスミドベクター中に容易にクローニングすることができる限界かまたはそれに近い。より多数のVセグメントの使用に備えるために、接合子またはES細胞内での相同組換えによってラット3'エンハンサー配列、ヒトC μ 、ヒトC γ 1、ヒトJセグメント、ヒトDセグ

DA4およびDK4を含む3.2 kb XbaI断片(図18中の断片(c))を単離する。

図18中の断片(b), (c)および(d)を結合し、pGP1のXbaI/XhoI部位中にクローニングして、10.6 kb 挿入断片を含むpHIG2を形成せしめる。

このクローニングは連続的に行われる。まず、図18の5.2 kb断片(b)と図18の2.2 kb断片(d)を子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理し、そしてXhoIとXbaIで消化されたpGP1中にクローニングする。生じたクローンを5.2 kbおよび2.2 kb挿入断片を用いてスクリーニングする。5.2 kbおよび2.2 kb挿入断片での試験に陽性であるそれらのクローンの半分が、BamHI消化により確かめると正しい方向で5.2 kb挿入断片を有する。次いで図18の3.2 kb XbaI断片を、断片(b)と(d)を含むこの中間プラスミド中にクローニングし、pHIG2を形成せしめる(図9)。このプラスミドは、ユニーク5' SfiI部位とユニーク3' SpeI部位を有するポリリンカー中にクローニングされた多様性セグメントを含む。完全なポリリンカーはNotI部位により隣接される。

H. 重鎖小遺伝子座の作製

下記は、1または複数のVセグメントを含むヒト重鎖小遺伝子座の作製を説明する。

Newkirkら(1988), *J. Clin. Invest.*, 81, 1511-1518のハイブリドマ中に含まれるVセグメントとして同定されたものに相当する再配列されていないVセグメントを、次のオリゴヌクレオチド:

```
5' - GAT CCT GGT TTA GTT AAA GAG
      GAT TTT ATT CAC CCC TGT GTC - 3'
```

を使って単離する。

再配列されていないVセグメントの制限地図を調べて、消化する

メントおよび多数のヒトVセグメントを含むトランスジェンを形成する。重複DNA断片の生体内相同組換えを下記に記載する。

ヒトJセグメントを含む6.3 kb BamHI/HindIII断片(図14中の断片(a)を参照のこと)を、次のアダプター:

```
5' GAT CCA AGC AGT 3'
5' CTA GAC TGC TTG 3'
5' CGC GTC GAA CTA 3'
5' AGC TTA GTT CGA 3'
```

を使って、MluI/SpeIで消化されたpHIG5'中にクローニングする。

生成したプラスミドをpHIG5'0(重複)と命名する。このプラスミド中に含まれる挿入断片はヒトV, DおよびJセグメントを含む。pVH1からの単一Vセグメントが使われる時、この挿入断片のサイズは約17 kb + 2 kbである。この挿入断片を単離し、そしてヒトJ, C μ , γ 1およびラット3'エンハンサー配列を含むpHIG3'からの挿入断片と組み合わせる。両挿入断片は、2つのDNA断片の間の約6.3 kbの重複部分に備えるヒトJ配列を含む。これらをマウス接合子中に同時注入すると、生体内相同組換えが起こり、pHIG中に含まれる挿入断片と同等のトランスジェンを生成する。

このアプローチは生体内で形成されるトランスジェン中への多数のVセグメントの付加に備える。例えば、単一のVセグメントをpHIG5'中に組み込む代わりに、(1)単離されたゲノムDNA、(2)ゲノムDNAから誘導された連結DNA、または(3)合成VセグメントレパートリーをコードするDNA、上に含まれる多数のVセグメントをpHIG2のSfiI部位にクローニングしてpHIG5'V $_n$ を作製する。次いで図14のJセグメント断片(a)をpHIG5'V $_n$ 中にクローニングし、そして挿入断片を単離する。この挿入断片は、pHIG3'から単離した

挿入断片上に含まれるJセグメントと重複するJセグメントと多数のVセグメントを含むようになる。これをマウス接合子の核中に同時注入すると、相同組換えが起こり、多数のVセグメントおよび多数のJセグメント、多数のDセグメント、C μ 領域、C α 1領域（全てヒト由来）並びにラット3'エンハンサー配列をコードするトランスジェンを生成する。

J. 合成VH領域断片と重鎖DJC構成物

との同時注入による重鎖小遺伝子座の作製

上述した通りに合成V μ 領域断片を作製しそして単離する。それらの断片を、プラスミドpHIG（または全くVセグメントを含まないpHIGの変形）の精製NotI挿入断片と一緒に同時注入する。同時注入されたDNA断片は染色体の単一部位に挿入される。生じたトランスジェニック動物の一部は、pHIG構成物中の前記配列の近隣に且つ上流に置かれた合成V領域を有するトランスジェン挿入断片を含むだろう。それらの動物は、実施例5（H）に記載の動物よりも多数のヒト重鎖一次レパートリーを有するであろう。

実施例6

軽鎖小遺伝子座の作製

A. pE μ 1の作製

pE μ 1の作製は図21に描写される。オリゴ：

5' GAA TGG GAG TGA GGC TCT CTC ATA CCC TAT TCA GAA CTC ACT 3' を使ってファージクローンから678 bpのXbaI-EcoRI断片（J. Banerjiら(1983), *Cell*, 33, 729-740）においてマウス重鎖エンハンサーを単離する。

このE μ 断片を、EcoRI部位の平滑末端フィルインにより、EcoRV/XbaI消化されたpGP1中にクローニングする。生じたプラスミド

いるラムダFIX II（Stratagene, La Jolla, California）中にクローニングする。16 kb SmaI画分の連結はSmaI部位を破壊するがXhoI部位はそのまま残す。

11 kb BamHI画分を、クローニング前にBamHIで消化したラムダFIX II（Stratagene, La Jolla, California）中にクローニングする。

各ライブラリーからのクローンを、C κ 特異的オリゴ：

5' GAA CTG TGG CTG CAC CAT CTG TCT TCA TCT TCC CGC CAT CTG 3' を用いて探査する。

C κ がSmaIに隣接するように、16 kb XhoI挿入断片をXhoIで切断されたpE μ 1中にサブクローニングする。生じたプラスミドをpKap1と命名する。図22を参照のこと。

上記C κ 特異的オリゴヌクレオチドを用いて λ EMBL3/BamHIライブラリーを探索し、図20の断片(d)に相当する11 kb クローンを同定する。5 kb SmaI断片（図20の断片(b)）をサブクローニングし、次いでSmaIで消化されたpKap1中に挿入する。正しい方向のJセグメント、C κ およびE μ エンハンサーを含むそれらのプラスミドをpKap2と命名する。

その後、1または複数のV κ セグメントをpKap2のMluI中にサブクローニングし、ヒトV κ セグメント、ヒトJ κ セグメント、ヒトC κ セグメントおよびヒトE μ エンハンサーをコードするプラスミドpKapHを生ぜしめる。pKapHをNotIで消化することによりこの挿入断片を切り出し、そしてアガロースゲル電気泳動により精製する。こうして精製された挿入断片を上述の如くマウス接合子の前核中にマイクロインジェクトする。

C. 生体内相同組換えによる κ 軽鎖小遺伝子座の作製

11 kb BamHI断片（図20の断片(d)）を、その3'末端がSfiI部

をpE μ 1と命名する。

B. κ 軽鎖小遺伝子座の作製

κ 構成物は、少なくとも1つのヒトV κ セグメント、5つのヒトJ κ セグメント全部、ヒトJ-C κ エンハンサー、ヒト κ 定常領域エクソン、および理想的にはヒト3' κ エンハンサーを含む（K. Meyerら(1989), *EMBO J.*, 8, 1959-1964）。マウスの κ エンハンサーはC κ から9 kb下流である。しかしながら、ヒトではまだ同定されていない。加えて、該構成物はマウス重鎖J-C μ エンハンサーの1コピーも含む。

この小遺伝子座は次の4つの成分断片から作製される：

(a)マウス遺伝子座との類推によりヒトC κ エクソンと3' ヒトエンハンサーとを含む16 kb SmaI断片（図20中の断片(a)）；

(b)5つのJセグメント全部を含む5' 隣接5 kb SmaI断片（図20中の断片(b)）；

(c)pE μ 1から単離されたマウス重鎖イントロンエンハンサー（この配列は、B細胞発達のできるだけ初期に軽鎖構成物の発現を誘導するために含まれる。重鎖遺伝子は軽鎖遺伝子よりも初期に転写されるため、この重鎖エンハンサーはおそらくイントロン κ エンハンサーよりも早い段階で活性であろう。）および

(d)1または複数のVセグメントを含む断片。

この構成物の調製は次の通りである。ヒト胎盤DNAをSmaIで消化し、電気泳動によりアガロース上で分画する。同様に、ヒト胎盤DNAをBamHIで消化し、電気泳動により分画する。SmaIで消化したゲルから16 kb 画分を単離し、同様にBamHIで消化したDNAを含むゲルから11 kb 領域を単離する。

16 kb SmaI画分を、XhoIで消化されXhoI制限消化生成物をフィルインするためにクレノウ断片DNAポリメラーゼで処理されて

位の方に向くように、BamHIで消化されたpGP1中にクローニングする。生じたプラスミドをpKAPintと命名する。pKAPint中のBamHI部位とSpeI部位との間のポリリンカー中に1または複数のV κ セグメントを挿入してpKapHVを作製する。pKapHVの挿入断片をNotIでの消化により切り出し、そして精製する。pKap2からの挿入断片をNotIでの消化により切り出し、精製する。それらの2断片の各々は、pKapHVからの断片が、pKap2から得られる挿入断片に含まれる5 kb SmaI断片と実質的に相同であるJ κ セグメントを含む5 kbのDNA配列を含むという点で、相同性領域を含有する。それ故に、それらの挿入断片は、マウス接合子中にマイクロインジェクトされると相同組換えして、V κ 、J κ およびC κ をコードするトランスジェンを形成することができる。

D. 軽鎖JC構成物と合成V κ 領域断片との

同時注入による κ 軽鎖小遺伝子座の作製

上記の如く合成V κ 領域断片を作製し、単離する。それらのDNA断片をプラスミドpKap2またはプラスミドpKapHの精製NotI断片と同時に注入する。同時注入されたDNA断片は染色体の単一部位に挿入される。生成するトランスジェニック動物の一部は、pKap2またはpKapH構成物の該配列の近隣で且つ上流に置かれた合成V領域を有するトランスジェン挿入断片を含むだろう。それらの動物は実施例6（B）に記載のものよりも多数のヒト κ 軽鎖一次レパートリーを有するだろう。

実施例7

免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子の再配列され発現される

コピーに相当するゲノムクローンの単離

この実施例は、着目の免疫グロブリンを発現する培養細胞からの

免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子のクローニングを記載する。そのような細胞は、与えられた免疫グロブリン遺伝子の多数の対立遺伝子を含み得る。例えば、ハイブリドーマは4コピーのκ軽鎖遺伝子を含み、その2コピーは融合相手の細胞系からのものであり、2コピーは着目の免疫グロブリンを発現するもとのB細胞からのものである。それらの4コピーのうち、数個が再配列することができるという事実にもかかわらず、ただ1つだけが着目の免疫グロブリンをコードする。この実施例に記載の手順は、κ軽鎖の発現コピーの選択的クローニングを考慮したものである。

A. 二本鎖cDNA

ヒトハイブリドーマもしくはリンパ腫からの細胞、または細胞表面形態もしくは分泌形態またはその両形態のκ軽鎖含有IgMを合成する他の細胞系を、ポリA⁺ RNAの単離に使用する。次いで該RNAを、逆転写酵素を使ったオリゴdT開始cDNAの合成に使用する。次いで一本鎖cDNAを単離し、ポリヌクレオチドターミナルトランスフェラーゼ酵素を使って3'末端にG残基を付加する。次いでG末端が付けられた一本鎖cDNAを精製し、そしてプライマーとして次のオリゴヌクレオチド:

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG CCC CCC CCC - 3' を使った第二鎖合成 (DNAポリメラーゼ酵素により触媒される) のための鋳型として用いる。

二本鎖cDNAを単離し、発現される免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖をコードするmRNAの5'末端のヌクレオチド配列を決定するために使用する。次いで、それらの発現される遺伝子のゲノムクローンを単離する。発現される軽鎖遺伝子のクローニング方法は、下記のB部に要約される。

B. 軽鎖

グメントの内側に Sma I 部位がある場合には BamHI または KpnI で切断する。いずれかの生成した非平滑末端をT4 DNAポリメラーゼ酵素で処理し、平滑末端化DNA分子を与える。次いで制限部位をコードするリンカー (断片中にどの部位が存在しないかに応じて BamHI, EcoRI または Xho I) を付加し、そして対応するリンカー酵素で切断して BamHI, EcoRI または Xho I 末端を有する DNA断片を与える。次いで該DNAをアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画し、発現されるVセグメントを包含するDNA断片を含む画分をラムダEMBL3またはラムダFIX (Stratagene, La Jolla, California)中にクローニングする。ユニークプローブo-カップを使って、Vセグメント含有クローンを単離する。陽性クローンからDNAを単離し、そして pKapI のポリリンカー中にサブクローニングする。生じたクローンを pRKI と命名する。

実施例 8

免疫グロブリン重鎖μ遺伝子の再配列され発現されるコピーに相当するゲノムクローンの単離

この実施例は、着目の免疫グロブリンを発現する培養細胞からの免疫グロブリン重鎖μ遺伝子のクローニングを記載する。この実施例に記載の手順は、μ重鎖遺伝子の発現コピーの選択的クローニングを考慮したものである。

実施例7のA部に記載した如く、二本鎖cDNAを精製し単離する。この二本鎖cDNAを変性せしめ、次のオリゴヌクレオチドプライマー:

5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG ACA GGA GAC
GAG GGG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC - 3'

を使った3番目のDNA合成のための鋳型として使用する。

このプライマーは、μ重鎖情報の定常部分に特異的な配列 (ACA

A部に記載された二本鎖cDNAを変性せしめ、次のオリゴヌクレオチドプライマー:

5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG TCA TCA GAT
GGC GGG AAG ATG AAG ACA GAT GGT GCA - 3'

を使った第3番目のDNA合成のための鋳型として使用する。

このプライマーは、κ軽鎖情報の定常部分に特異的な配列 (TCA TCA GAT GGC GGG AAG ATG AAG ACA GAT GGT GCA) 並びに新たに合成されるDNA鎖のPCR増幅のためのプライマーとして使うことができるユニーク配列 (GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG) を含む。この配列を、次の2つのオリゴヌクレオチドプライマー:

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'
5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG - 3'

を使ってPCRにより増幅せしめる。

PCR増幅された配列をゲル電気泳動により精製し、そしてプライマーとして次のオリゴヌクレオチド:

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'

を使うジデオキシ配列決定反応のための鋳型として使用する。

次いで、該配列の最初の42ヌクレオチドを使って、免疫グロブリン情報が転写された遺伝子を単離するためのユニークプローブを合成する。このDNAの合成42ヌクレオチドセグメントを、以後o-カップと称することにする。

Ig発現細胞系から単離しそして個別におよびSma Iを含む幾つかの異なる制限エンドヌクレアーゼと対に組み合わせ消化したDNAのサザンブロットを、³²P標識したユニークオリゴヌクレオチドo-カップを用いて探査する。ユニーク制限エンドヌクレアーゼ部位は、再配列されたVセグメントの上流に同定される。

次いでIg発現細胞系からのDNAを Sma I および第二の酵素 (Vセ

GGA GAC GAG GGG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC) 並びに新たに合成されるDNA鎖のPCR増幅のためのプライマーとして使うことができるユニーク配列 (GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG) を含む。この配列を、次の2つのオリゴヌクレオチドプライマー:

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'
5' - GTA CTC CAT ATC AGC TGG ATG AAG - 3'

を使ってPCRにより増幅せしめる。

PCR増幅された配列をゲル電気泳動により精製し、そしてプライマーとして次のオリゴヌクレオチド:

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'

を使ったジデオキシ配列決定反応のための鋳型として使用する。

次いで、該配列の最初の42ヌクレオチドを使って、免疫グロブリン情報が転写された遺伝子を単離するためのユニークプローブを合成する。このDNAの合成42ヌクレオチドセグメントを、以後o-ミューと称することにする。

Ig発現細胞系から単離しそして個別におよびMlu I (Mlu Iは、JセグメントとμCHIとの間を開裂する弱少切断性酵素である)を含む幾つかの異なる制限エンドヌクレアーゼと対に組み合わせ消化したDNAのサザンブロットを、³²P標識したユニークオリゴヌクレオチドo-ミューを用いて探査する。ユニーク制限エンドヌクレアーゼ部位は、再配列されたVセグメントの上流に同定される。

次いでIg発現細胞系からのDNAを Mlu I および第二の酵素で切断する。次いで Mlu I または Spe I アダプターリンカーを末端に連結せしめ、切断して上流部位を Mlu I または Spe I に交換する。次いで該DNAをアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画し、発現されるVセグメントを包含するDNA断片を含む画分をプラスミドpGPI中に直接クローニングする。ユニークプローブo-ミューを使ってVセ

グメント含有クローンを単離し、その挿入断片を *Mlu*I でまたは *Mlu*I / *Spe*I で切断されたプラスミド pCON2 中にサブクローニングする。生じたクローンを pRMGH と命名する。

実施例9

相同組換えによるマウス重鎖遺伝子の欠失

この実施例は、胎児性幹(ES)細胞中での相同組換え [Zijlstraら (1989), *Nature*, 342, 435-438] による内因性マウス重鎖遺伝子の欠失に次いで、生成したキメラマウスの生殖細胞にES細胞が移住するようにそれらのES細胞をマウス胚盤胞胚中に移植すること (Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, E. J. Robertson編, IRL Press, Washington, D.C., 1987) を記載する。

重鎖Jセグメントを欠失せしめ、よって重鎖遺伝子座における好結果の遺伝子再配列の可能性を排除するようにマウス染色体中に相同に組み換わるであろうDNA配列を作製する。この構成物のデザインを下記に要約する。

プラスミド pGP1 を制限エンドヌクレアーゼ *Bam*HI および *Bgl*II で消化し、そして再連結せしめてプラスミド pGP1d1 を得る。次いでこのプラスミドを使っていわゆる遺伝子破壊 (ノックアウト) 構成物を構築する。

マウスゲノムの所望の標的領域に相同な配列を得るために、非リンパ系組織 (例えば肝臓) から誘導されたファージライブラリーから、次のJ。特異的オリゴヌクレオチドプローブ:

5' - GGT CTA TGA TAG TGT GAC TAC TTT GAC TAC
TGG GGC CAA GGC - 3'

を使ってマウスゲノムクローンを単離する。

相同組換えの全体効率を更に向上させるために、標的配列に相同であるDNAの大セグメントを構成物に付加する。下記のCμ特異的オリゴヌクレオチド

5' - GCA TCC TGG AAG GTT CAG ATG AAT ACC
TTG TAT GCA AAA TCC - 3'

とハイブリダイズする13 kb *Eco*RI 断片を使う。

Cμコードエクソンを含むこの12 kb 断片、または5' *Eco*RI 末端を含む該断片の実質的部分を、マウスゲノムファージライブラリーから単離し、そしてpMK03 の *Eco*RI 部位中にサブクローニングする。生じたプラスミドをpMK04 と命名する。

pMK04 の挿入断片をNot I で消化により単離し、次いでES細胞中にエレクトロポレーションする。相同組換え体クローンを単離し、Zijlstraら(1989), *Nature*, 342, 435-438により記載された通りにJ。欠失マウスの作製に使用する。

実施例10

相同組換えによるマウス軽鎖遺伝子の欠失

この実施例は、胎児性幹細胞中での相同組換えによる内因性マウス軽鎖遺伝子の欠失を記載する (前記実施例を参照のこと)。

マウス染色体中に相同に組み換わりκ軽鎖定常領域エクソンを欠失せしめるDNA配列を作製する。この構成物のデザインを下記に要約する。

プラスミド pGEN7(TK)Sal (M.A. Rudnicki, Whitehead Institute) から2 kb *Bam*HI - *Eco*RI チミジンキナーゼ断片を単離し、そして次のオリゴヌクレオチドアダプター:

5' - AATTTTG - 3'

を使って、*Bam*HI / *Sfi*I で消化されたpGP1中にサブクローニング

陽性のファージクローンから誘導されたDNAから、このプローブとハイブリダイズする3.5 kb *Kpn*I - *Eco*RI 断片を単離する。この断片を *Kpn*I / *Eco*RI で消化されたpGP1d1中にサブクローニングし、プラスミド pMK01 を形成せしめる。

次のようにして、組換え体の薬剤選択のためのネオマイシン耐性 (Neo) 遺伝子および単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子 (M. Capecchi (1989), *Science*, 244, 1288-1292) を単離する。プラスミド pGEN7(KJ1) (M.A. Rudnicki, 3/15/89) を *Hind*III で消化し、そしてDNA pol I のクレノウ形で末端を平滑化する。次いで該DNAを *Eco*RI で消化してpGKNeo断片を単離し、次のオリゴヌクレオチド:

5' - AATTCATG - 3'

をアダプターとして使って、*Sph*I / *Nae*I で切断されたpMK01 中にクローニングする。

生じたプラスミドをpMK02 と命名する。このプラスミドは、マウスJ。セグメントを隣接する配列により隣接されたネオマイシン耐性遺伝子を含む。このプラスミドを単独で重鎖遺伝子の欠失に使うことができる。あるいは、ヘルペスTK遺伝子を該構成物に付加して、Neo 耐性クローンにおける相同組換え現象の頻度を向上させることができる (M. Capecchi (1989), *Science*, 244, 1288-1292)。これは次のようにして行われる。pGEN7(TK) (M.A. Rudnicki) の *Eco*RI - *Hind*III PGKTK断片を単離し、そしてアダプターとして次のオリゴヌクレオチド:

5' - AATTGTAC - 3'

5' - AGCTGTAC - 3'

を使って pMK02 の *Kpn*I 部位にクローニングする。生じたプラスミドを pMK03 と命名する。

する。生じたプラスミドをpKK01 と命名する。

マウスゲノムの所望の標的領域に相同な配列を得るために、非リンパ系組織 (例えば肝臓) から誘導されたファージライブラリーから、o-MKC と命名された次のマウスκ軽鎖特異的オリゴヌクレオチド:

5' - GGC TGA TGC TGC ACC AAC TGT ATC CAT
CTT CCC ACC ATC CAG - 3'

を使ってマウスゲノムクローンを単離する。

陽性のクローンからDNAを単離し、そしてo-MKC3 プローブとハイブリダイズする2.3kb *Bgl*II 断片 (P.S. Neumaier および H.G. Zachau (1983), *Nucl. Acids Res.*, 11, 3631-3656) を単離する。o-MKC3 プローブの配列は次の通りである:

5' - CAT TCT GGG TAT GAA GAG CCC ACG TAT
CAA AGG TTA CAT TAG - 3'

この2.3 kb *Bgl*II 断片を、該断片の3' 末端がポリリンカー部位に隣接するように、*Bam*HI で消化されたpKK01 中にサブクローニングする。

オリゴヌクレオチド o-MKC とハイブリダイズする4 kb *Sph*I - *Hpa*I DNA断片を陽性ファージクローンから単離し、そして *Eco*RI / *Sph*I で消化されたプラスミド pKK02 中にサブクローニングする。生じたプラスミドをpKK03 と命名する。

pGEN7(KJ1)Sal (M.A. Rudnicki, 3/15/89) の2 kb *Sal*I - *Eco*RI 断片を単離し、リンカーアダプターを使ってプラスミド pKK03 の *Bss*HI 部位中にサブクローニングする。これは、まず次の3つのオリゴヌクレオチド:

5' - CAGCGCGC - 3'

5' - GATCGCGCGCTG - 3'

5' - AATTGCGCGCTG - 3'

の混合物を2 kb Sal I - EcoRI 断片に連結せしめることによって行われる。次いでこの連結混合物を酵素BssHIIで消化し、そしてBssHIIで消化されたプラスミドpKK03に連結せしめる。生じたプラスミドをpKK04と命名する。

pKK04の挿入断片をNotIでの消化により単離し、次いでES細胞中にエレクトロポレーションする。相同組換え体クローンを単離し、Zijlstraら(1989), *Nature*, 342, 435-438により記載された通りにC κ 欠失マウスの作製に使用する。

実施例11

相同組換えによるマウス κ 軽鎖遺伝子の不活性化

この実施例は、胎児性幹(ES)細胞中での相同組換えによるマウス内因性 κ 遺伝子座の不活性化に次いで、不活性化された κ 対立遺伝子を有する標的ES細胞を初期マウス胚(胚盤胞)中に注入することによるマウス生殖細胞系中への変異遺伝子の導入を記載する。

方便は、J κ 遺伝子とC κ セグメントに及ぶ遺伝子座の4.5 kbセグメントが欠失されそして選択マーカーneoにより置き換えられているマウス κ 遺伝子座に相同なDNA配列を含むベクターを用いた相同組換えによりJ κ 遺伝子とC κ 遺伝子を欠失せしめることである。

κ 標的ベクターの作製

プラスミドpGEM7(KJ1) (M.A. Rudnicki, Whitehead Institute) は、クローニングベクターpGEM-72f(+)中のマウスホスホグリセレートキナーゼ(pgk)プロモーター [Xba I / I / Taq I断片: Adra, C.N.ら(1987), *Gene*, 60, 65-74] の転写調節下に、トランスフェクトされたES細胞の薬剤選択に使うネオマイシン耐性遺伝子(neo)を含む。このプラスミドは、マウスpgk遺伝子の3'領域に由来す

る、neo遺伝子によって異種のポリアデニル化部位(PvuII/Hind III断片: Boer, P.H.ら(1990) *Biochemical Genetics*, 28, 298-308)も含む。このプラスミドを κ 標的ベクターの作製のための出発点として使った。第一段階はneo発現カセットの3'の κ 遺伝子座に相同な配列を挿入することであった。

C κ 遺伝子座に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ:

5' - GGC TGA TGC TGC ACC AAC TGT

ATC CAT CTT CCC ACC ATC CAG - 3'

およびJ κ 遺伝子セグメントに特異的なオリゴヌクレオチドプローブ:

5' - CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC

AAG CTG GAG CTG AAA CGT AAG - 3'

を使って、肝臓DNAから誘導されたゲノムフェージライブラリーから、マウス κ 領域配列(図25a)を単離した。

陽性フェージクローンから2断片において、即ち1.2 kb Bgl II / Sac I断片と6.8 kb Sac I断片として、マウスC κ セグメントの3'に及ぶ8 kb Bgl II / Sac I断片を単離し、それをBgl II / Sac Iで消化されたpGEM(KJ1)中にサブクローニングし、プラスミドpNEO-K3'を作製した(図25b)。

J κ 領域の5'に及ぶ1.2 kb EcoRI / Sph I断片も陽性フェージクローンから単離した。この断片のSph I部位にSph I / Xba I / Bgl II / EcoRIアダプターを連結せしめ、生じたEcoRI断片をneo遺伝子および下流の3' κ 配列と同じ5' → 3'方向で、EcoRIで消化されたpNEO-K3'に連結せしめ、pNEO-K5'3' (図25c)を作製した。

次いで、Mansourら[(1988) *Nature*, 336, 348-352]により記載されたようにして、相同組換え体有するESクローンの富化に備

えるために、該構成物中に単純ヘルペスウイルス(HSV)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子を含めた。プラスミドpGEM7(TK) (M.A. Rudnicki)からHSV TKカセットを得た。このカセットは、pGEM7(KJ1)について上述したのと同様に、マウスpgkプロモーターとポリアデニル化配列とにより隣接されたHSV TK遺伝子の構造配列を含む。pGEM7(TK)のEcoRI部位をBamHI部位に変更し、そしてTKカセットをBamHI / Hind III断片として切り出し、pGP1b中にサブクローニングしてpGP1b-TKを作製した。このプラスミドをXho I部位のところで線状化し、J κ の5'からのゲノム配列とC κ の3'からのゲノム配列とにより隣接されたneo遺伝子を含む、pNEO-K5'3'からのXho I断片をpGP1b-TK中に挿入し、標的ベクターJ/C K1 (図25d)を作製した。J/C K1を用いた相同組換え後のゲノム κ 遺伝子座の推定構造を図25eに示す。

κ 対立遺伝子の標的不活性化によるES細胞の作製および分析

本質的には記載された通りに[Robertson, E.J.(1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson編 (Oxford: IRL Press), 71-112頁]、分裂上不活性なSNL76/7支持細胞層[McMahon, A.P.およびBradley, A. (1990) *Cell*, 62, 1073-1085]上でAB-1細胞を増殖させた。

κ 不活性化ベクターJ/C K1をNotIで消化し、そして記載された方法(Hasty, P.R.ら(1991) *Nature*, 350, 243-246)によりAB-1細胞中にエレクトロポレートせしめた。エレクトロポレートされた細胞を100 μ g/ml上に2 ~ 5 $\times 10^5$ 細胞/皿の密度で接種した。24時間後、G418 (200 μ g/mlの活性成分)およびFIAU (0.5 μ M)を培地に添加し、10~11日に渡り薬剤耐性クローンを発選させた。クローンを採取し、トリプシン処理し、2部分に分け、更に増殖させた。次いで、各クローンからの細胞の半分を凍結させ、もう半分

をベクターと標的配列との間の相同組換えについて分析した。

サザンブロットハイブリダイゼーションによりDNA分析を行った。記載の如く[Laird, P.W.ら(1991), *Nucl. Acids Res.*, 19]クローンからDNAを単離し、Xba Iで消化し、そして特徴的プローブとして図25eに指摘の800 bp EcoRI / Xba I断片を用いて探査した。このプローブは野生型遺伝子座中の3.7 kb Xba I断片、および標的ベクターと相同組換えされた遺伝子座中の特徴的1.8 kbバンドを検出した(図25aおよびeを参照のこと)。サザンブロット分析によりスクリーニングした358個のG418およびFIAU耐性クローンのうち、4つのクローンが κ 遺伝子座での相同組換えを示す1.8 kb Xba Iバンドを有した。それらの4つのクローンを更にBgl II, Sac IおよびPst I酵素で消化し、 κ 対立遺伝子のうちの1つに該ベクターが相同的に組み込まれたことを確認した。特徴的800 bp EcoRI / Xba I断片を用いて探査すると、野生型DNAのBgl II, Sac IおよびPst I消化物がそれぞれ4.1, 5.4および7 kbの断片を生成し、一方標的された κ 対立遺伝子の存在はそれぞれ2.4, 7.5および5.7 kbの断片により指摘された(図25aおよびeを参照のこと)。Xba I消化物により検出された4つの陽性クローンの全てが、 κ 領域のところで相同組換えに特徴的な期待のBgl II, Sac IおよびPst I制限断片を示した。

不活性化された κ 組を有するマウスの作製

前の章で記載した4つの標的されたESクローンを、記載の如く[Bradley, A. (1987), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson編 (Oxford: IRL Press), 113-151頁] C57Bl/6J胚盤胞中に注入し、そして偽妊娠雌の子宮に移し、注入ES細胞から誘導された細胞と宿主の胚盤胞との混合物を表すキメラマウスを作製する。黒いC57Bl/6J背景上にお

る、ES細胞系に由来するアグーチ皮膚着色の存在により、キメラ動物を外観的に同定する。ABI ES細胞はXY細胞系であるので、雄のキメラをC57BL/6Jと交配させ、子孫を優性のアグーチ皮膚着色の存在について観察する。アグーチ子孫はESゲノムの生殖細胞伝達の指標である。κ鎖不活性化についてのアグーチ子孫の異型接合性は、標的されたESクローンの同定に用いた特徴的のプロープを使って、尾部生検試料からのDNAのサザンブロット分析により確かめる。次いで、異型接合体の兄弟-姉妹交配を行い、κ鎖変異に対して同型接合性のマウスを生成せしめる。

実施例12

相同組換えによるマウス重鎖遺伝子の不活性化

この実施例は、胎児性幹(ES)細胞中での相同組換えによる内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子の活性化を記載する。方策は、J_κ領域が欠失されそして選択マーカー遺伝子neoにより置き換えられている重鎖配列を含むベクターとの相同組換えにより内因性重鎖Jセグメントを欠失せしめることである。

重鎖標的ベクターの作製

J_κ4 特異的オリゴヌクレオチドプロープ:

5' -ACT ATG CTA TGG ACT ACT GGG GTC AAG GAA CCT CAG TCA CC G - 3'

を使って、D3 ES細胞系[Gossler ら(1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 9065-9069] から誘導されたゲノムファージライブラリーから、J_κ領域を含むマウス重鎖配列(図26a)を単離した。

J_κ領域に及ぶ3.5 kbゲノム Sac I / Stu I 断片を陽性ファージクローンから単離し、それを Sac I / Sma I で消化された puc18 中

/Xho I 断片を誘導した。図26aと26bに示されるように、このXba I 部位はゲノムDNA中には存在せず、むしろ陽性ファージクローン中のクローン化ゲノム重鎖挿入断片にすぐに隣接するファージ配列から誘導される。この断片を Xba I / Xho I で消化された pGMT-TK 中にサブクローニングし、プラスミド pGMT-TK-J_κ 5' (図26d)を作製した。

作製の最終段階は、neo 遺伝子および隣接するゲノム配列を含む puc18 J_κ-neoからの3 kb EcoRI断片の切除を含んだ。この断片をクレノウポリメラーゼにより平滑末端にし、同様に平滑末端化された pGMT-TK-J_κ 5' の Xho I 部位中にサブクローニングした。生じた構成物 J_κKOI (図26e)は、J_κ遺伝子座を隣接する6.9 kbのゲノム配列を含み、neo 遺伝子が中に挿入されているJ_κ領域に及ぶ2.3 kbの欠失を有する。図26fは、標的構成物との相同組換え後の内因性重鎖対立遺伝子の構造を示す。

実施例13

標的されたES細胞の生産および分析

本質的には記載された通りに[Robertson, E. J. (1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson編 (Oxford: IRL Press), 71-112頁]、分裂上不活性なSNL76/7 支持細胞層(McMahon, A. P. およびBradley, A. (1990) *Cell*, 62, 1073-1085) 上でAB-1細胞を増殖させた。

重鎖不活性化ベクター J_κKOI を Not I で消化し、そして記載された方法(Hasty, P. R. ら (1991) *Nature*, 350, 243-246) によりAB-1細胞中にエレクトロポレートせしめた。エレクトロポレートされた細胞を100 mm皿上に2 ~ 5 × 10⁵ 細胞/皿の密度で接種した。24時間後、G418 (200 μg/mlの活性成分) およびFIAU (0.5mM) を

にサブクローニングした。生じたプラスミドをpuc18 J_κと命名した。プラスミドpGEM7(KJ1)から、トランスフェクトされたES細胞の薬剤選別に用いるネオマイシン耐性遺伝子(neo)を誘導した。pGEM7 (KJ1) 中のHind III部位を合成アダプターの付加によって Sal I 部位に変更し、そして Xba I / Sal I での消化によりneo 発現カセットを切り出した。次いで neo断片の両端を DNA pol I のクレノウ形での処理により平滑末端化し、puc18 J_κ の Nae I 部位中にサブクローニングし、プラスミド puc18 J_κ-neo (図26b) を作製した。

標的ベクターの更なる作製は、プラスミドpGP1bの誘導体において行った。pGP1b を制限酵素 Not I で消化し、アダプターとして次のオリゴヌクレオチド:

5' -GGC CGC TCG ACG ATA GCC TCG AGG CTA TAA ATC TAG AAG AA T TCC AGC AAA GCT TTG GC - 3'

と連結せしめた。

生じたプラスミド (pGETと命名) を使ってマウス免疫グロブリン重鎖標的構成物を構築した。

Mansour ら [(1988) *Nature*, 336, 348-352] により記載されたようにして、相同組換え体を有するESクローンの富化に備えるために、該構成物中に単純ヘルペスウイルス(HSV) チミジンキナーゼ(TK)遺伝子を含めた。プラスミドpGEM(TK)からEcoRI とHind IIIでの消化によりHSV TK遺伝子を得た。このTK DNA断片をpGMTのEcoRI 部位とHind III部位との間にサブクローニングし、プラスミドpGMT-TK (図26c) を作製した。

標的配列に対する広範な相同性領域を提供するために、陽性ゲノムファージクローンから Xho I でのDNAの限定消化および Xba I での部分消化により、J_κ領域の5' に位置する5.9 kbのゲノムXba I

増地に添加し、8 ~ 10日間に渡り薬剤耐性クローンを発選させた。クローンを採取し、トリプシン処理し、2部分に分け、更に増殖させた。次いで、各クローンからの細胞の半分を凍結させ、もう半分をベクターと標的配列との間の相同組換えについて分析した。

サザンブロットハイブリダイゼーションによりDNA分析を行った。記載の如く[Laird, P. W. ら(1991), *Nucl. Acids Res.*, 19] クローンからDNA を単離し、Hind IIIで消化し、そして特徴的のプロープとして図26fに示される500 bp EcoRI/Stu I断片を用いて探査した。このプロープは野生型遺伝子座中の 2.3 kb Hind III断片を検出し、一方で5.3 kbバンドは標的ベクターと相同組換えされた標的遺伝子座に特徴的である(図26aおよびfを参照のこと)。重鎖対立遺伝子の標的破壊を確かめるために酵素 Spe I, Stu I およびBamHI で追加の消化を行った。

実施例14

重鎖小遺伝子座トランスジェン

A. 大型のDNA配列をクローニングするためのプラスミドベクターの作製

1. pGP1a

プラスミドpBR322を EcoRIと Sty I で消化し、そして次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-42 5' -caa gag ccc gcc taa tga gcg ggc ttt ttt ttt cat act gcg gcc gct - 3'

オリゴ-43 5' -aat tag cgg ccg cag tat gca aaa aaa agc ccg ctc att agg cgg gct - 3'

と連結せしめた。

生じたプラスミド pGP1aを、稀少切断性制限酵素 Not I により切

完全な反応の結果として3' Xho Iを保持している。pJM2は完全なヒトJ領域、重鎖J-μイントロンエンハンサー、μスイッチ領域およびμ定常領域エクソン全部、並びにμ欠失に関係する2つの0.4 kbの直接反復σμおよびΣμを含有する。

3. D領域クロンの単離およびpDHIの作製

次のヒトD領域特異的オリゴヌクレオチド:

オリゴ-4 5' - tgg tat tac tat ggt tgg ggg agt tat tat
aac cac agt gtc - 3'

を用いて、ヒト胎盤ゲノムライブラリーをD領域クロンについてスクリーニングした。ファージクロンλ4.1とλ4.3を単離した。D要素D_{1.1}, D_{1.2}およびD_{1.3} (Y. Ichihara ら (1988) *EMBO J.*, 7, 4141)を含む5.5 kbの Xho I断片をファージクロンλ4.1から単離した。D要素D_{1.1}, D_{1.2}, D_{1.3}およびD_{1.4}を含む上流の隣接5.2 kb Xho I断片をファージクロンλ4.3から単離した。それらのD領域 Xho I断片の各々をプラスミドベクターpSP72 (Promega, Madison, WI)のSal I部位中にクロニングし、2配列を結合する Xho I部位を破壊した。次いで上流断片を Xho Iと Sma Iで切り出し、下流断片を EcoRVと Xho Iで切り出した。得られた単離断片を Sal Iで消化されたpSP2と一緒に連結せしめ、プラスミドpDHIを与えた。pDHIは、少なくとも7つのDセグメントを含む Xho I (5') およびEcoRV (3') で切り出すことができる10.6 kbの挿入断片を含有する。

4. pCOR1

プラスミドpJM2をAsp718 (Kpn Iのアイソソマー)で消化し、そしてDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を用いて突出末端をフィルインした。次いで生じたDNAを Cla Iで消化し、挿入断片を単離した。この挿入断片をpDHIのXho I/EcoRV挿入断片およびXho I/

ンλSgl.13を単離した。異なるファージクロンのサブクラスを決定するために、鑄型として上記3つのファージクロンの各々のサブクロンを使ってそしてプライマーとして次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-67 5' - tga gcc cag aca ctg gac - 3'

を使って、ジデオキシ配列決定反応を実施した。

ファージクロンλ29.5とλSγ1.13は両方ともγ1サブクラスであると決定された。

2. pγe1

γ1コード領域を含むファージクロンλ29.5の7.8 kb Hind III断片をpUC18中にクロニングした。生じたプラスミドpLTIを Xho Iで消化し、クレノウ断片で処理し、そして再連結せしめて内部 Xho I部位を破壊した。生じたクロンpLTixをHind IIIで消化し、挿入断片を単離し、pSP72中にクロニングしてプラスミドクロンpLTixsを作製した。ポリリンカー Xho I部位とヒト配列由来のBamHI部位のところでのpLTixsの消化は、γ1定常領域コードエクソンを含む7.6 kb断片を与えた。この7.6 kb Xho I/BamHI断片を、ファージクロンλ29.5からの隣接の下流4.5 kb BamHI断片と一緒に、Xho I/BamHIで消化されたpGPe中にクロニングし、プラスミドpγe1を作製した。pγe1は、ラット重鎖3'エンハンサーに連結された、5 kbの下流配列と共にγ1定常領域コードエクソンの全部を含有する。

3. pγe2

γ1スイッチ領域とスイッチ前繁殖不能転写物 (sterile transcript) (S. Sideras ら (1989) *International Immunol.*, 1, 631)の第一エクソンとを含む5.3 kbのHind III断片をファージクロンλSγ1.13から単離し、そして挿入断片の5'末端の近隣にポリリンカー Xho I部位を有するpSP71中にクロニングし、プラスミドク

Cla I消化pGPeと連結せしめ、pCOR1を作製した (図29)。

5. pVH251

2つのヒト重鎖可変領域セグメントV_H 251とV_H 105 (C.G. Humphries ら (1988) *Nature*, 331, 446)を含む10.3 kbのゲノムHind III断片をpSP72中にサブクロニングし、プラスミドpVH251を与えた。

6. pIGM1

プラスミドpCOR1を Xho Iで部分消化し、そしてpVH251の単離 Xho I/Sal I挿入断片を上流の Xho I部位にクロニングし、プラスミドpIGM1 (図30)を作製した。pIGM1は、下記の配列要素の全部が Not Iでの消化によりベクター配列を含まない単一断片において単離することができるように、2つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのヒトDセグメント、6つのヒトJ_Hセグメント全部、ヒトJ-μエンハンサー、ヒトσμ要素、ヒトμスイッチ領域、ヒトμコードエクソン全部およびヒトΣμ要素を、ラット重鎖3'エンハンサーと共に含有する。

C. IgMとIgGを発現する小遺伝子座トランスジェンpHC1の作製

1. γ定常領域クロンの単離

次のヒトIgG定常領域遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチド:

オリゴ-29 5' - cag cag gtc cac acc caa tgc cca tga gcc
cag aca ctg gac - 3'

を用いてヒトゲノムライブラリーをスクリーニングした。ファージクロンλ29.4とλ29.5を単離した。γスイッチ領域を含むファージクロンλ29.4の4 kb Hind III断片を使って、ファージベクターラムダFIX™ II (Stratagene, La Jolla, CA)中にクロニングされたヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーを探索した。ファージクロ

ンpSγ1sを作製した。pSγ1sの Xho I/Sal I挿入断片を Xho Iで消化されたpγe1中にクロニングし、プラスミドクロンpγe2を作製した (図31)。pγe2は、ラット重鎖3'エンハンサーに連結された、下流の5 kb配列と共に、γ1定常領域コードエクソン全部並びに上流のスイッチ領域および繁殖不能転写物エクソンを含有する。

4. pHC1

プラスミドpIGM1を Xho Iで消化し、43 kb挿入断片を単離し、そして Xho Iで消化されたpγe2中にクロニングし、プラスミドpHC1を作製した (図30)。pHC1は、下記の配列要素の全部が Not Iでの消化によりベクター配列を含まない単一断片において単離しそしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクションしてトランスジェニック動物を作製することができるように、ラット重鎖3'エンハンサーと共に、2つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのヒトDセグメント、6つのヒトJ_Hセグメント全部、ヒトJ-μエンハンサー、ヒトσμ要素、ヒトμスイッチ領域、ヒトμコードエクソン全部、ヒトΣμ要素、およびヒトγ1定常領域 (関連のスイッチ領域および繁殖不能転写物関連エクソンを含む)を含有する。

D. IgMとIgGを発現する小遺伝子座トランスジェンpHC2の作製

1. ヒト重鎖V領域遺伝子VH49.8の単離

ヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーラムダFIX™ II (Stratagene, La Jolla, CA)を、次のヒトVH1ファミリー特異的オリゴヌクレオチド:

オリゴ-49 5' - gtt aaa gag gat ttt att cac ccc tgt gtc
ctc tcc aca ggt gtc - 3'

を用いてスクリーニングした。

ファージクローンλ49.8を単離し、そして可変セグメントVH49.8を含む6.1 kb Xba I断片をpNN03中にサブクローニングし(ポリリンカーCla I部位がVH49.8の下流にそしてポリリンカー Xho I部位が上流にくるように)、プラスミドpVH49.8を作製した。この挿入断片の800 bp領域を配列決定すると、VH49.8は転写解鎖並びに完全なスプライシングシグナルおよび組換えシグナルを有することがわかり、よって該遺伝子が機能的であることを指摘する(表2)。

TTCTCAGG	AGGATTAGG	GCTGGTTC	TGAGATCC	ACACTGTAC	50
AGCTGATG	GCATCTGT	TTCTTTTC	ATCTAGATC	AACTTTGAG	100
CTGTGAATA	CCCTGCTCA	TGAATTCGA	AAATATCTGA	GGTCTCTGA	150
GATAAATA	GATATTTG	TGCTGTGA	GCATACATA	ACACGAGAT	200
TCTCTCTTA	AGAGAGCCC	TGGAGGCA	GCTCATACC	ATGACTTGA	250
CCCTGAGGT	CCCTTTTGT	GTCGAGAG	CTACAGTaa	ggggcttcc	300
htTpArgph	eLeuPheVal	ValAlaAlaA	laThr		
agtcctaaag	ctgggaaag	gatcctgggt	tagttaaaga	ggatcttatt	350
cacccctggg	tcctctccac	agGTTCCAG	TCCAGGTC	AGCTGGTCA	400
		GlyValGln	SerGlnValG	InLeuValG	
GTCGGGCT	GAGTGAGA	AGCTGGGT	CTGGGTAG	GTCCTCTGA	450
nSerGlyAla	GluValLysL	ysProGlySe	rSerValLys	ValSerCysL	
AGCTTTCTG	AGGCCTTTC	AGCAGCTATC	CTATCAGCTG	GGTGGACAG	500
ysAlaSerG	yGlyThrPhe	SerSerTyrA	laIleSerTr	pValArgGln	
GGCTGTGAC	AGGGCTTGA	GTCGATGGA	AGGATATCC	CTATCTTGG	550
AlaP-roGlyG	InGlyLeuG	uTrpmetGly	ArgIleIleP	rolleLeuG	
TATAGCAAC	TAGGCAGA	AGTTCCAGG	CAGATCAGG	ATTACCGGG	600
ylleAlaAsn	TyrAlaGlnL	ysPheGlnG	yArgValThr	IleThrAlaA	
ACAAATCCG	GAGCAGGC	TACATGGAC	TGAGCAGCT	GAGATCTGAG	650
splysSerTh	rSerThrAla	TyrMetGlul	euSerSerLe	uArgSerGlu	
GACCGGGG	TGATATCTG	TGCGAGGAC	ACATCTGAA	AGCCACATC	700
AspThAlaV	altTrpTyrCy	sAlaArg			
CTG-GTGT	CTG-AGCT	G-GG-GAG	G-GCTGTGC	CGGGCTGAG	750
AGATG-CAGG	GTTATTAGG	TTTAGGCTG	TTTCAAAAT	GGTTATATA	800
TTTGAGAAA	AA				812

表2 ヒトV₁ファミリー遺伝子V₁49.8の配列

2. pV2

プラスミドpUC12中にサブクローニングされたヒトV₁ IVファミリー遺伝子V₁4-21 (I. Sanzら(1989) EMBO J., 8, 3741)を含む4 kb Xba Iゲノム断片をSma IとHind IIIで切り出し、ポリメラーゼIのクレノウ断片で処理した。平滑末端化された断片を、Cla Iで消化されクレノウで処理されたpVH49.8中にクローニングした。生じたプラスミドpV2は、挿入断片の3'末端のユニークSal I部位および5'末端のユニークXho I部位を使って、同じ方向でVH4-21の上流に連結された、ヒト重鎖遺伝子VH49.8を含む。

3. pSγ1-5'

近隣の上流3.1 kb Xba I断片と一緒に0.7 kb Xba I/Hind III断片(プラスミドpγe2中の5.3 kb γ1スイッチ領域含有断片のすぐ上流で且つそれに隣接した配列を表す)をファージクローンλSgl.13から単離し、そしてHind III/Xba Iで消化されたpUC18ベクター中にクローニングした。生じたプラスミドpSγ1-5'は、γ1イソタイプにスイッチする前のB細胞中に見つかる繁殖不能転写物(sterile transcript) (P. Siderasら(1989) International Immunol., 1, 631)の開始部位の上流の配列を表す3.8 kb挿入断片を含む。該転写物はイソタイプスイッチの開始に関係があり、そして上流のシス作用性配列はしばしば転写調節に重要であるので、繁殖不能転写物の正しい発現および関連するスイッチ組換えを促進するためにそれらの配列がトランスジェン構成物に含まれる。

4. pVGE1

pSγ1-5'挿入断片をSma IとHind IIIで切り出し、クレノウ酵素で処理し、そして次のオリゴヌクレオチドリンカー:

5'-ccg gtc gac cgg-3'

と連結せしめた。この連結生成物をSal Iで消化し、Sal Iで消化

されたpV2に連結せしめた。生じたプラスミドpVPは、2つの機能的ヒト可変遺伝子セグメントVH49.8とVH4-21(表2参照)の下流に連結された3.8 kbのγ1スイッチ5'隣接配列を含む。Sal Iでの部分消化およびXho Iでの完全消化の後、アガロースゲル上での15 kb断片の精製により、pVP挿入断片を単離する。次いで該挿入断片をpγe2のXho I部位中にクローニングし、プラスミドクローンpVGE1(図32)を作製する。pVGE1は、ヒトγ1定常遺伝子および関連のスイッチ領域の上流に2つのヒト重鎖可変遺伝子セグメントを含有する。可変領域と定常領域との間のユニークSal I部位を用いて、D、Jおよびμ遺伝子セグメントをクローニングすることができる。γ1遺伝子の3'末端にラット重鎖3'エンハンサーが連結され、そして挿入断片全体はNot I部位により隣接される。

5. pH2

プラスミドクローンpVGE1をSal Iで消化し、pIGM1のXho I挿入断片をその中にクローニングした。生じたクローンpH2(図30)は、4つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのDセグメント、6つのヒトJ_Hセグメント全部、ヒトJ_H-μエンハンサー、ヒトσ_H要素、ヒトμスイッチ領域、ヒトμコードエクソン全部、ヒトΣ_H要素、およびヒトγ1定常領域(繁殖不能転写物開始部位の上流の4 kb隣接配列と共に、関連のスイッチ領域と繁殖不能転写物関連エクソンを含む)を含有する。それらのヒト配列は、前記配列要素全部をNot Iでの消化によりベクター配列を含まない単一鎖上に単離しそしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を生ぜしめることができるように、ラット重鎖3'エンハンサーに連結される。該挿入断片の5'末端のユニークXho I部位を使って、追加のヒト可変遺伝子セグメントをその中にクローニングし、この重鎖小遺伝子座の組換え多様性を更に

増大させることができる。

E. トランスジェニックマウス

プラスミドpIGM1 およびpHC1の Not I 挿入断片をアガロースゲル電気泳動によりベクター配列から単離した。複製された挿入断片を、受懐した (C57BL/6 × CBA) F2マウスの胚の前核中にマイクロインジェクトし、そして生存している胚を、Hogan らにより記載された通りに (B. Hogan, F. Constantini および E. Lacy, Methods of Manipulating the Mouse Embryo, 1986, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 偽妊娠した雌に移した。注入された胚から発育したマウスを、尾部DNAのサザンブロット分析によりトランスジェン配列の存在について分析した。既知量のクローン化DNAを含む対照標準物に比較したバンド強度により、トランスジェンコピー数を評価した。3～8週齢において、それらの動物から血清を単離し、そしてHarlowおよびLane (E. Harlow および D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) により記載されたように、トランスジェンによりコードされるヒトIgM およびIgG1の存在について ELISAによりアッセイした。マイクロタイタープレートのウェルを、ヒトIgM に特異的なマウスモノクローナル抗体 (クローンAF6, #0285, AMAC, Inc. Westbrook, ME) およびヒトIgG に特異的なマウスモノクローナル抗体 (クローンJL512, #0280, AMAC, Inc. Westbrook, ME) によりコーティングした。該ウェル中に血清試料を連続的に希釈し、予備吸着させることによってマウス免疫グロブリンとの交差反応性を最小限にしたアフィニティー単離されたアルカリホスファターゼ接合ヤギ抗ヒトIg (多価) を用いて、特異的免疫グロブリンの存在を検出した。図33は、プラスミドpHC1のトランスジェン挿入断片を注入した胚から発育した2匹の動物の血清中のヒトIgM およびIgG1

の存在についての ELISAアッセイの結果を示す。1匹の動物 (#18) は、サザンブロット分析によればトランスジェンについて陰性であり、検出可能レベルのヒトIgM またはIgG1を全く示さなかった。2番目の動物(#38) は、サザンブロット分析によれば該トランスジェンの約5コピーを含んでおり、そして検出可能レベルのヒトIgM とIgG1の両方を示した。トランスジェンを注入した胚から発育した11匹の動物についてのELISA アッセイの結果を下表(表3)に要約する。

表3 ELISA アッセイによるトランスジェニック動物の血清中のヒトIgMおよびIgG1の検出

動物 #	注入したトランスジェン	ヒトトランスジェン 数(細胞あたり)	ヒトIgM	ヒトIgG1
6	pIGM1	1	++	-
7	pIGM1	0	-	-
9	pIGM1	0	-	-
10	pIGM1	0	-	-
12	pIGM1	0	-	-
15	pIGM1	10	++	-
18	pHC1	0	-	-
19	pHC1	1	-	-
21	pHC1	<1	-	-
26	pHC1	2	++	+
38	pHC1	5	++	+

表3は、組み込まれたトランスジェンDNAの存在と血清中のトランスジェンによりコードされる免疫グロブリンとの間の相関関係を示す。pHC1トランスジェンを含むことがわかった動物のうちの2匹は、検出可能なレベルのヒト免疫グロブリンを発現しなかった。それらは共に低コピー動物であり、該トランスジェンの完全なコピーが含まれていないか、または該動物が遺伝的モザイクを有している(動物#21)について評価された細胞あたり<1コピーにより指摘される)ことがあり、そしてトランスジェン含有細胞が造血系統に移っていない場合がある。あるいは、トランスジェンがそれらの発現に至らないゲノム領域中に組み込まれている場合がある。pIGM1 トランスジェニック動物の血清中のヒトIgMの検出、並びにpHC1トランスジェニック動物の血清中のヒトIgMとIgG1の検出は、トランスジェン配列がVDJ結合、転写およびイソタイプスイッチを指令する上で正しく機能することを指摘する。

実施例15

再配列された重鎖トランスジェン

A. 再配列されたヒト重鎖VDJセグメントの単離

ファージベクターλEMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)中にクローニングされた2種のヒト白血球ゲノムDNAライブラリーを、ヒト重鎖J-μイントロンエンハンサーを含むλ1.3の1 kb Pac I /HindIII断片を用いてスクリーニングする。陽性クローンを、次のV。特異的オリゴヌクレオチド:
オリゴ7 5' - tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga
tac acc ttc acc- 3'
オリゴ8 5' - tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga
ttc acc ttc agt- 3'

の混合物とのハイブリダイゼーションについて試験する。

VプロンプとJ-μプロンプの両方とハイブリダイズするクローンを単離し、そして再配列されたVDJセグメントのDNA配列を決定する。

B. 再配列されたヒト重鎖トランスジェンの作製

機能的VDJセグメントを含む断片(転写開始点およびスプライシング信号)を、プラスミド由来の Xho I 部位が挿入断片配列の5'末端に隣接するように、プラスミドベクターpSP72中にサブクローニングする。機能的VDJセグメントを含むサブクローンを Xho I とPac I (Pac I はJ-μイントロンエンハンサー近くの部位を認識する稀少な切断酵素である)で消化し、そして挿入断片を Xho I /Pac I で消化されたpHC2中にクローニングし、機能的VDJセグメント、J-μイントロンエンハンサー、μスイッチ要素、μ定常領域コードエクソンおよびγ1定常領域(これは繁殖不能転写物関連配列、γ1スイッチおよびコードエクソンを含む)を有するトランスジェン構成物を作製する。上述したように、このトランスジェン構成物を Not I で切り出し、そしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を作製する。

実施例16

軽鎖トランスジェン

A. プラスミドベクターの作製

1. プラスミドベクター-pGPIc

プラスミドベクター-pGPIa を Not I で消化し、そして次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ81 5' - ggc cgc atc ccg ggt ctc gag gtc gac aag
ctt tgc agg atc cgc- 3'

オリゴ-82 5' -ggc cgc gga tcc tcc aaa gct tgt cga cct
cga gac ccg gga tgc- 3'

をその中に連結せしめる。生じたプラスミドpGP1cは、Not I 部位により隣接された Xba I, Xho I, Sal I, Hind III および Bam HI 制限部位を有するポリリンカーを含む。

2. プラスミドベクター-pGP1d

プラスミドベクター-pGP1a を Not I で消化し、そして次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-87 5' -ggc cgc tgc cga caa gct tat cga tgg atc
ctc gag tgc- 3'

オリゴ-88 5' -ggc cgc act cga gga tcc atc gat aag ctt
gtc gac agc- 3'

をその中に連結せしめる。生じたプラスミドpGP1dは、Not I 部位により隣接された Sal I, Hind III, Cla I, Bam HI および Xho I 制限部位を有するポリリンカーを含む。

B. J κ およびC κ クロンの単離

ファージベクター λ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)中にクローニングされたヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーを、ヒト κ 軽鎖J領域特異的オリゴヌクレオチド:

オリゴ-36 5' -cac ctt cgg cca agc gac acg act gga gat
taa acg taa gca- 3'

を用いてスクリーニングし、そしてファージクローン136.2と136.5を単離する。136.2からJ κ 1セグメントを含む7.4 kb Xho I断片を単離し、プラスミドpNN03中にサブクローニングしてプラスミドクローンp36.2を作製する。C κ 遺伝子セグメントと共にJ κ セグメント2~5を含む近隣の13 kb Xho I断片をファージクローン136.5から単離し、そしてプラスミドpNN03中にサブクローニング

の重鎖J- μ イントロンエンハンサーから成る。この2.3 kb断片を単離し、pGP1c中にクローニングしてpMHE2を作製する。pMHE2をSal Iで消化し、p36.5の13 kb Xho I挿入断片をその中にクローニングする。生じたプラスミドpCK2は、マウスとヒトの重鎖J- μ イントロンエンハンサーがトランスジェン挿入断片の3'末端に融合していること以外は、pCK1と同一である。最終トランスジェンの発現を調節するために、異なるエンハンサー、即ちマウスまたはラットの3' κ または重鎖エンハンサー (K. MeyerおよびM. S. Neuberger (1989) EMBO J., 8, 1959-1964; S. Pettersson ら (1990) Nature, 344, 165-168) を使って類似構成物を作製することができる。

2. 再配列された κ 軽鎖可変セグメントの単離

ファージベクター λ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)中にクローニングされた2つのヒト白血球ゲノムDNAライブラリーを、p36.5の3.5 kb Xho I/Sma I断片を含むヒト κ 軽鎖J領域を用いてスクリーニングした。陽性クローンを、次のV κ 特異的オリゴヌクレオチド:

オリゴ-65 5' -agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac
ttc act ctc acc atc agc- 3'

とのハイブリダイゼーションについて試験した。VプロンプとJプロンプの両方とハイブリダイズしたクローンを単離し、そして再配列されたVJ κ セグメントのDNA配列を決定する。

3. 再配列されたヒト軽鎖構成物を含有するトランスジェニックマウスの作製

機能的VJセグメントを含む断片(転写解鎖およびスプライスシグナル)をベクターpCK1およびpCK2のXho I部位中にサブクローニングし、再配列された κ 軽鎖トランスジェンを作製する。Not I

してプラスミドクローンp36.5を作製する。それら2つのクローンを一緒にすると、J κ 1の7.2 kb上流で始まりC κ の9 kb下流で終わる領域に及ぶ。

C. 再配列された軽鎖トランスジェンの作製

1. 再配列された可変セグメントを発現させるためのC κ ベクターpCK1

C κ 遺伝子を含むプラスミドクローンp36.5の13 kb Xho I断片を、9 kbの下流配列と一緒に、該挿入断片の5'末端がプラスミドXho I部位に隣接した状態で、プラスミドベクター-pGP1cのSal I部位中にクローニングする。生じたクローンpCK1は、再配列されたVJ κ セグメントを含むクローン化断片をユニーク5' Xho I部位に収容することができる。次いで該トランスジェンをNot Iで切り出し、ゲル電気泳動によってベクター配列から精製する。得られたトランスジェン構成物は、ヒトJ-C κ イントロンエンハンサーを含むであろうし、ヒト3' κ エンハンサーを含むことができる。

2. 再配列された可変セグメントを発現させるための重鎖エンハンサー含有C κ ベクターpCK2

マウス重鎖J- μ イントロンエンハンサー (J. Banerjiら (1983) Cell, 33, 729-740)を含むマウスゲノムDNAの0.9 kb Xba I断片をpUC18中にサブクローニングし、プラスミドpJH22.1を作製した。このプラスミドをSph Iにより線状化し、クレノウ酵素を用いて末端をフィルインした。クレノウ処理されたDNAを次いでHind IIIで消化し、そしてヒト重鎖J- μ イントロンエンハンサー (A. Hayday ら (1984) Nature, 307, 334-340)を含むファージクローン λ 1.3 (前の実施例)のMlu I (クレノウ)/Hind III断片をそれと連結した。生じたプラスミドpMHE1は、両者が単一のBam HI/Hind III断片上に切除されるように、pUC18中に一緒に連結されたマウスとヒト

での消化により該トランスジェン構成物をベクター配列から単離する。アガロースゲル上で精製した挿入断片をマウス胚の前核中にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを作製する。ヒト κ 鎖を発現している動物を、重鎖小遺伝子を含有するトランスジェニック動物(実施例14)と交配し、ヒト抗体を完全に発現するマウスを作る。

VJ κ 組合せの全部が、広域スペクトルの種々の重鎖VDJ組合せと共に安定な重鎖-軽鎖複合体を形成できるわけではないので、それぞれ異なる再配列されたVJ κ クローンをを使って幾つかの異なる軽鎖トランスジェン構成物を作製し、そして重鎖小遺伝子座トランスジェンを発現するマウスと交配させる。二重トランスジェニック(重鎖構成物と軽鎖構成物の両方)動物から、末梢血、脾臓およびリンパ動リンパ球を単離し、ヒトおよびマウスの重鎖および軽鎖免疫グロブリンに特異的な蛍光抗体 (Pharmingen, San Diego, CA)で染色し、そしてFACSscan 分析装置 (Becton Dickinson, San Jose, CA)を使ってフローサイトメトリーにより分析する。最大数のB細胞の表面上に最高レベルのヒト重鎖/軽鎖複合体を生じ且つ免疫細胞区分に悪影響を与えない(BおよびT細胞サブセット特異的抗体を用いたフローサイトメトリー分析によりアッセイした時)再配列された軽鎖トランスジェン構成物を、ヒトモノクローナル抗体の産生のために選択する。

D. 再配列されていない軽鎖小遺伝子座トランスジェンの作製

1. 小遺伝子座トランスジェンを作製するためのJ κ , C κ 含有ベクター-pJCK1

p36.5の13 kbのC κ 含有Xho I挿入断片をクレノウ酵素で処理し、Hind IIIで消化されクレノウ処理されたプラスミドpGP1d中にクローニングする。挿入断片の5'末端がベクター由来のCla I部位

に隣接するようなプラスミドクローンを選択する。生じたプラスミド p36.5-1d を Cla I で消化し、クレノウで処理する。p36.2 の J κ I 含有 7.4 kb Xho I 挿入断片をクレノウで処理し、そして Cla I で消化されクレノウ処理された p36.5-1d 中にクローニングする。p36.2 挿入断片が p36.5 挿入断片と同じ方向にあるクローンを選択する。このクローン pJCK1 (図 34) は、7.2 kb の上流配列および 9 kb の下流配列と一緒に、完全なヒト J κ 領域および C κ 領域を含む。該挿入断片はヒト J-C κ イントロンエンハンサーも含み、ヒト 3' κ エンハンサーを含むこともある。該挿入断片は、追加の 3' 隣接配列、例えば重鎖または軽鎖エンハンサーをクローニングする目的でユニーク 3' Sal I 部位により隣接される。ユニーク Xho I 部位は、再配列されていない V κ 遺伝子セグメント中でクローニングする目的で該挿入断片の 5' 末端に置かれる。ユニーク Sal I および Xho I 部位は、最終のトランスジェン構成物をベクター配列から単離するために使われる Not I 部位により隣接される。

2. 再配列されていない V κ 遺伝子セグメントの単離およびヒト Ig 軽鎖タンパク質を発現するトランスジェニック動物の作製
V κ 特異的オリゴヌクレオチドであるオリゴ-65 (上述) を使って、ファージベクター λ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中にクローニングされたヒト胎盤ゲノム DNA ライブラリーを探索する。生じたクローンからの変換遺伝子セグメントを配列決定し、そして機能的と思われるクローンを選択する。機能性を判断するための基準は、転写解読、完全なスプライス受容体および供与体配列、並びに完全な組換え配列を含むことである。選択された変換遺伝子セグメントを含む DNA 断片を、プラスミド pJCK1 のユニーク Xho I 部位にクローニングし、小遺伝子座構成物を作製する。得られたクローンを Not I で消化し、挿入断片を単離

し、そしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクションしてトランスジェニック動物を作製する。それらの動物のトランスジェンは、B 細胞の発達の際に V-J 結合を受けるであろう。ヒト κ 鎖を発現する動物を、重鎖小遺伝子座を含有するトランスジェニック動物と交配し、ヒト抗体を完全に発現するマウスを得る。

実施例 17

合成重鎖可変領域

この実施例は図 35 に要約される。

A. クローニングベクター pVHf の作製

1. pGPf

プラスミド pGP1a (前の実施例) を Not I で消化し、そして次のオリゴヌクレオチドをそれと連結せしめる:

オリゴ-"a" 5' -ggc cgc atg cta ctc gag tgc aag ctt ggc
cat cca- 3'

オリゴ-"b" 5' -ggc ctg gat ggc caa gct tgc act cga gta
gca tgc- 3'

生じたプラスミド pGPf は、Not I 部位と Sfi I 部位とにより隣接された Sph I、Xho I および Hind III 部位を含む。

2. pVHf

ヒト V μ -V ファミリー可変遺伝子セグメント V μ 251 (C.G. Humphries ら (1988) *Nature*, 331, 446) を約 2.4 kb の 5' 隣接配列と約 1.4 kb の 3' 隣接配列と一緒に、4.2 kb の Sph I/Hind III 断片上においてプラスミド pVH251 (前の実施例) から単離し、そしてプラスミドベクター pSelectTM-1 (Promega Corp., Madison, WI) 中にクローニングした。5' 隣接配列を、V μ 251 のプロモーター、第一エクソンおよび第一イントロンと一緒に、次のオリゴヌクレオ

チドを使ったポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によりこの鎖型から増幅させる:

オリゴ-83 5' -cag ctc gag ctc ggc aca ggc gcc tgt ggg- 3'
オリゴ-84 5' -ctc tag agt cga cct gca ggc- 3'

3' 隣接配列を、次のオリゴヌクレオチドを使った PCR により増幅させる:

オリゴ-85 5' -agc ctc gag ccc gtc taa aac cct cca cac- 3'
オリゴ-86 5' -ggc gac act ata gaa tac tca agc- 3'

増幅された 5' 配列を Sph I と Xho I で消化し、そして増幅された 3' 配列を Hind III と Xho I で消化する。得られた断片と一緒にプラスミド pGPf 中にクローニングし、プラスミド pVHf を作製する。プラスミド pVHf は、シグナル配列をコードする第一エクソンと共に、V μ 251 の転写を調節するシス作用性調節要素を含有する。pVHf は重鎖可変配列のための発現カセットとして使われる。そのような配列は後述のような Kas I/Xho I で消化されたプラスミド中にクローニングされる。

B. 可変遺伝子コード配列の単離

1. 発現される V μ 遺伝子 cDNA 配列の増幅

ヒト末梢血リンパ球 (PBL) からポリ (A)⁺ RNA を単離する。逆転写酵素を用いて、プライマーとしてオリゴ-(dT) を使って、第一鎖 cDNA を合成する。第一鎖 cDNA を単離し、そしてターミナルトランスフェラーゼを使ってオリゴ(dG)末端を付加する。次いで、Frohman ら (1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998) の方法の変形により、IgM 転写物の 5' 配列を特異的に増幅させる。dG 末端を付加した第一鎖 PBL cDNA を用いたポリメラーゼ連鎖反応において、オリゴ-(dC)₁₀ および次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-69 5' -gga att ctc aca gga gac gag- 3'

をそれぞれ 5' および 3' プライマーとして使用する。オリゴ-69 は IgM 定常領域のアミノ酸 11-17 をコードする配列に相補的である。従って、それらのプライマーは、発現される V μ 遺伝子配列を含む約 0.6 kb の DNA 断片を増幅させるだろう。

2. 生殖型遺伝子形態への cDNA 配列の逆変換

次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-"c" 5' -ctg acg act ctg tat ggc gcc (ct)a(cg)
(cg)(ct)(cg)ag (ag)t(cg) ca(ag) ct(gt) gtg
(cg)a(ag) tc(gt) gg(gt)- 3'

を、変性され PCR 増幅された IgM 5' 配列にアニールせしめる。オリゴ-"c" は、Kas I 部位を含む 21 ヲクレオチド非縮重配列に次いで、多数のヒト V μ セグメントの第二エクソンの 5' 末端に相同である 30 ヲクレオチド縮重配列を含有する (Genbank: Los Alamos, NM)。このプライマーを DNA ポリメラーゼで伸長し、生成物をサイズ分画により未使用のプライマーから単離する。次いで該生成物を変性せしめ、次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-"d" 5' -ggg ctc gag gct ggt ttc tct cac tgt gtg
t(cgt)t (acgt)(ag)(ct) aca gta ata ca(ct)
(ag)g(ct)- 3'

にアニールせしめる。

オリゴ-"d" は、Xho I 部位と V-D J 組換え配列の一部を含む 30 ヲクレオチド非縮重配列に次いで、多数のヒト可変遺伝子セグメントのフレームワーク領域 3 中の最後の 7 アミノ酸をコードする配列に相補的である 21 ヲクレオチド縮重配列を含有する。アニールしたオリゴヌクレオチドを DNA ポリメラーゼで伸長し、そして生成物をサイズ分画により未使用のプライマーから単離する。個々の可変遺伝子断片の配列保全性を確実にするために、DNA 合成の 1 週終了ご

とにプライマーの除去を行う。オリゴ-"d" プライマー伸長生成物を、プライマーとして次の2つのオリゴヌクレオチド:

オリゴ-"e" 5' - ctg acg act ctg tat ggc gcc - 3'

オリゴ-"f" 5' - ggg ctc gag gct ggt ttc tct - 3'

を使ってPCRにより増幅せしめる。得られた0.36 kbのPCR生成物をゲル電気泳動により精製し、制限酵素KasIとXhoIにより消化する。次いで消化生成物をKasI/XhoIで消化されたpVHf中にクローニングし、生殖細胞型配置において発現される可変遺伝子配列のライブラリーを作製する。pVHfのKasI部位中への連結は、第二エクソンの5'末端のところにスプライス受容体部位を再構築し、XhoI部位中への連結は可変遺伝子セグメントの3'末端のところに組換えシグナルを再構築する。縮重オリゴヌクレオチド"c"および"d"の別の変形を使って異なる集団の可変遺伝子を増幅せしめ、それらの異なる集団を表す生殖細胞型配置のライブラリーを作製する(Genbank: Los Alamos, NN)。

c. 合成遺伝子座の作製

合成生殖細胞型配置V。遺伝子のライブラリー全体を一緒に増殖させ、プラスミドを単離する。中程度コピープラスミドpVHf(これはアンピシリン耐性遺伝子とクローニング部位との間に強力な転写ターミネーターを含む)は、ライブラリー内の特定のクローンの増大を最小にするためにデザインされる。プラスミドDNAをSfiIで消化し、子ウシ腸ホスファターゼで処理して5'リン酸基を除去し、次いでNotIで消化する。SfiI末端のみが脱リン酸されるように、NotI消化前に子ウシ腸ホスファターゼを除去する。消化したDNAをアガロースゲル電気泳動によってベクター配列から単離し、そして次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-"g" 5' - ggc cta act gag cgt ccc ata tlg aga acc
tcc- 3'

概念は、ヒトT細胞レセプターコード配列を発現するトランスジェニックマウスを作製し、そしてそれらのマウスをヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスと交配させることにより拡張される。そのようなマウスにヒトT細胞レセプタータンパク質を含む単離物を接種し、そしてT細胞レセプターサブセットを認識するモノクローナル抗体を産生せしめる。

研究は、ある種の自己免疫疾患に関与するT細胞抗原レセプターには限定された変異性があることを証明している(T.F. Daviesら(1991)New England J. Med., 325, 238)。この限定された変異性のため、自己反応性であるヒトT細胞のサブセットを特異的に認識するヒトモノクローナル抗体を産生することが可能である。

A. B細胞サブセット特異的抗体の産生

ヒト免疫グロブリンを発現するトランスジェニックマウスに、健康な提供者からまたは高レベルの単一免疫グロブリン型を発現するB細胞癌性有する患者から単離した免疫グロブリンを接種する(Millerら(1982)New England J. Med., 306, 517-522)。HarlowおよびLaneにより記載されたように(E. HarlowおよびD. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製する。B細胞サブセットを特異的に認識するヒト抗体を分泌する個々のハイブリドーマを選択する。

B. ヒトT細胞レセプター配列を発現するトランスジェニックマウス

そのままの且つ完全に再配列されたヒトT細胞レセプター(TCR)αおよびβ遺伝子を含むDNA断片をマウス胚の前核中に同時注入し、トランスジェニック動物を作製する。トランスジェニック動物をFACS分析によりそれらのT細胞の表面上への両トランスジェンの発

オリゴ-"h" 5' - ggt tct caa tat ggg acg ctc agt ta- 3'に連結せしめる。オリゴ-"g"をリン酸化しないままでオリゴ-"h"をリン酸化する。V遺伝子断片のNotI末端の全部がオリゴヌクレオチドに連結し別のV領域断片には連結しないように、大モル過剰のオリゴヌクレオチドを使って連結反応を実施する。SfiI末端は自身とは適合しないので、Vセグメントは各Vセグメントが単一のオリゴヌクレオチドスパーサー単位により次のVセグメントから隔てられるようにして同じ方向で鎖状に連結するだろう。

大きな連鎖物を電気泳動によりサイズ分離し、アガロースゲルから単離する。次いで、サイズ分離された連鎖物をD-J-C含有DNA断片(例えばpHC1またはpHC2挿入断片)と一緒にマウス胚の前核中に同時注入し、多数の一次レパートリーを有するトランスジェニック動物を作製する。あるいは、該連鎖物をpGPIのようなプラスミドベクター中にクローニングする。

実施例18

リンパ系細胞レセプターサブセット特異的抗体の作製

異種(即ちヒト)免疫グロブリンレセプター(B細胞レセプター)またはT細胞レセプターによるマウスの接種は、優性的に、与えられた種の全てのもしくは大部分の免疫グロブリンまたはT細胞レセプターが共有する(しかし種間では異なる)特定のエピトープ(優性エピトープ)に対して向けられたマウス抗体の産生をもたらす。従って、B細胞またはT細胞レセプターの特定のサブセット(例えばイソタイプまたは可変領域ファミリー)を識別する抗体を単離することは困難である。しかしながら、ヒト免疫グロブリンを発現するマウス(上記実施例に記載)は、それらの共有のB細胞エピトープを免疫学的に寛容するであろうし、従ってヒト免疫グロブリンのサブセットを識別する抗体を産生せしめるのに有用であろう。この

現についてアッセイする。少量のT細胞において低レベルのみでヒトαおよびβ TCR鎖を発現する動物を選択する。免疫学的寛容を獲得するためにはごく低レベルのみの発現が要求され、高レベル発現は動物の免疫系を破壊し、モノクローナル抗体の産生に必要な免疫応答を開始する能力を妨害するであろう。あるいは、免疫学的寛容を獲得するためには正しい組織または細胞型特異的発現は要求されないで、TCR αおよびβ鎖cDNAクローンを非TCR転写シグナルの支配下にトランスジェン発現カセット(T. Choiら(1991)Mol. Cell Biol., 11, 3070-3074)中に挿入する。TCR αおよびβ鎖cDNAトランスジェン構成物をマウス胚の前核中に同時注入してトランスジェニック動物を作製する。TCRは多量複合体であるため(H. Cleversら(1988)Ann. Rev. Immunol., 6, 629-662)、TCR鎖の異所性発現は細胞表面発現をもたらさないだろう。しかしながら、細胞表面発現は抗原提示(Townsendら(1986)Nature, 324, 575-577)および寛容誘導には必要でない。

T細胞レセプターαおよびβ鎖トランスジェニックマウスをヒト免疫グロブリン発現性トランスジェニックマウスと交配し、ヒトT細胞の特異的サブセットを認識するヒトモノクローナル抗体を作製するのに有用であるマウスを作製する。そのようなマウスに、健康な患者からまたは単一のTCR型を発現するT細胞癌性有する患者から単離したT細胞由来タンパク質を接種する。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製し、そしてB細胞サブセットを特異的に認識するヒト抗体を分泌する個々のハイブリドーマを選択する。

実施例19

ゲノム重複ヒトIgトランスジェン

この実施例は、接合子中へのマイクロインジェクションまたはES細胞中への組込みによりマウス生殖細胞系に導入される、ヒトゲノム重複免疫グロブリン遺伝子のクローニングを記載する。

Marzluff, W.F.ら(1985), Transcription and Translation: A Practical Approach, B.D. Hammes および S.J. Higgins編, 89-129頁, IRL Press, Oxford により記載されたようにして、新鮮なヒト胎盤組織から核を単離する。単離された核(またはPBSで洗浄したヒト精母細胞)を0.5%低融点アガロースブロック中に埋め込み、そして核については500mM EDTA, 1% SDS中の1mg/mlのプロテイナーゼKにより、精母細胞については500mM EDTA, 1% SDS, 10mM DTT中の1mg/mlのプロテイナーゼKにより、50℃にて18時間溶解せしめる。該ブロックを40μg/mlのPMSF/TE中で50℃にて30分間インキュベートすることにより、プロテイナーゼKを不活性化させる。次いでM. Finney により Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubelら編, John Wiley & Sons, 増補4, 1988, 例え第2.5.1章)中に記載されたように、アガロース中で該DNAを制限酵素 Not I で消化する。

Not I で消化したDNAを、次いでAnand, R. により(1989), Nuc. Acids Res., 17, 3425-3433 により記載されたようにパルスフィールドゲル電気泳動により分離する。Not I 断片に富む画分をサザンハイブリダイゼーションによりアッセイし、この断片によってコードされる1または複数の配列を検出する。そのような配列は、重複Dセグメント、JセグメントおよびV1定常領域と共に6つのV_Hファミリー全部の代表物を含む(この断片はBernanら(1988), 前掲によればHeLa細胞から670 kb断片として同定されているけれども、本発明者らはそれがヒト胎盤および精子DNAからの830 kb断片であることを発見した)。このNot I 断片を含む画分(図4参照)を記載の

典型的には、2つの異なるDNA断片の同時注入は、染色体内の同一部位のところへの両断片の組込みをもたらす。従って、該2断片各々の少なくとも1コピーを含む生じたトランスジェニック動物の約50%が、定常領域含有断片の上流に挿入されたVセグメント断片を有する。それらの動物のうち、85 kb Spe I 断片の位置に関する570 kb Not I 断片の方向性に依存して、約50%がDNA逆位によりV-DJ結合を行い、そして約50%が欠失によりV-DJ結合を行うだろう。生じたトランスジェニック動物からDNAを単離し、そしてサザンブロットハイブリダイゼーションにより両方のトランスジェンを含んでいることが示された動物(詳しくは、多数のヒトVセグメントとヒト定常領域遺伝子の両方を含有する動物)を、標準技術に従って、ヒト免疫グロブリンを発現する能力について試験する。

実施例21

重複するYAC断片の連結

重複領域を有する2つのYACを、Silvermanら(1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9913-9917 により記載されたような減数分裂組換えにより酵母中で連結せしめ、小型の両YAC由来の配列を担持している単一の大型YACを誘導する。連結したYACが1つの動原体ベクターアームと1つの非動原体ベクターアームを含むように、2つのYACをアームに関して整列せしめる。必要であれば、挿入断片の両末端のユニーク制限部位を使って挿入断片を該ベクター中で再クローニングする。挿入断片がユニーク制限断片でないならば、Guthrie および Fink (前掲) により記載されたように、酵母のオリゴヌクレオチド形質転換によりベクターアーム中にユニーク部位を挿入する。重複しない不連続配列を有するYACを連結するためには、

如く(McCormick, M. により(1990), Technique 2, 65-71) ベクターpYACNNのNot I 部位中に連結せしめる。プラスミドpYACNNは、pYACneo (Clontech)をEcoRIで消化しそしてオリゴヌクレオチド5'-AAT TGC GGC CGC - 3'の存在下で連結せしめることにより、調製される。

Traverら(1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5898-5902 により記載された通りに、重複Not I 断片を含むYACベクターを単離する。クローニングされたNot I 挿入断片を、M. Finney, 前掲により記載されたようなパルスフィールドゲル電気泳動により高分子量酵母DNAから単離する。1mMスベルミンの添加によりDNAを濃縮し、上述した通り単細胞胚の核に直接マイクロインジェクションする。あるいは、DNAをパルスフィールドゲル電気泳動により単離し、そしてリポフェクション(Gnirkeら(1991), EMBO J., 10, 1629-1634)によりES細胞系に導入するか、またはYACをスフェロプラスト融合によりES細胞系に導入する。

実施例20

不連続ゲノム重複Igトランスジェン

V_H6、Dセグメント、Jセグメント、μ定常領域および一部のγ定常領域を含むヒトゲノムDNAの85 kb Spe I 断片(図4参照)は、本質的には実施例1に記載した通りのYACクローニングによって単離された。生殖細胞系可変領域由来の断片、例えば多コピーのV_H1-V_H6を含む上記の670-830 kb Not I 断片の上流の570 kb Not I 断片、を含有するYACを上述の如く単離する。(Bernanら(1988), 前掲は、各々が多数のVセグメントを含有する2つの570 kb Not I 断片を検出した。)この2断片を実施例1に記載の如くマウス単細胞胚の核中に同時注入する。

次のようにして重複を造成する。5' YACの3'末端領域と3' YACの3'末端領域をサブクローニングし、試験管内で連結せしめて結合断片を作り、そして相同組換え(Guthrie および Fink, 前掲)により一方または両方のYAC中に再導入する。次いで2つのYACを、Silverman により(前掲)により記載されたようにして減数分裂的に組換える。連結したYACを、例えば実施例1の如く、マウス系に導入する。

実施例22

ゲノムκ軽鎖ヒトIgトランスジェン

ヒトκ軽鎖の地図はLorenz, W.により(1987), Nucl. Acids Res., 15, 9667-9677 において記載されており、それを図11に示す。Cκ全部、3'エンハンサー、Jセグメント全部、および少なくとも5つの異なるVセグメントを含む450 kb Xho I -Not I 断片(a)、または上記の全部と少なくとも20多いVセグメントを含む750 kb Mlu I -Not I 断片(b)を単離し、そして実施例1に記載の如く接合子またはES細胞系に導入する。

実施例23

生体内相同組換えにより形成された

ゲノムκ軽鎖ヒトIgトランスジェン

750 kb Mlu I -Not I 断片をBssHIIで消化し、約400 kbの断片(c)を得る。450 kb Xho I -Not I 断片(a)と約400 kb Mlu I -BssHII断片(c)とは、図11に示されるBssHII制限部位とXho I 制限部位とにより範囲限定される配列重複を有する。それらの2断片の相同組換えは、450 kb Xho I /Not I 断片(実施例22)中に見つかるものよりも少なくとも15-20多い追加のVセグメントを含むトランスジェン

を生成する。

実施例24

トランスジェニックB細胞中の機能的に再配列された可変領域配列の同定

着目の抗原を使って、次の遺伝的特性：J_αの欠失（実施例9および12）については内因性所有鎖遺伝子座における同型接合性；再配列されていないヒト重鎖小遺伝子座トランスジェン（実施例5および14）の単一コピーについては半接合性；および再配列されたヒト軽鎖トランスジェン（実施例7および16）の単一コピーについては半接合性、を有するマウスを免疫処置する（HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (1988)を参照のこと）。

免疫処置スケジュールの後、脾臓を取り出し、脾細胞を使ってハイブリドーマを調製する。着目の抗原と反応性である抗体を分泌する個々のハイブリドーマクローンからの細胞を使ってゲノムDNAを調製する。ゲノムDNAの試料を、ユニークな6塩基対配列を認識する幾つかの異なる制限酵素で消化し、そしてアガロースゲル上で分離する。サザンブロットハイブリダイゼーションを使って2~10kb範囲内の2つのDNA断片を同定する。該断片の一方は、再配列されたヒト重鎖VDJ配列の単一コピーを含み、もう一方は再配列されたヒト軽鎖VJ配列の単一コピーを含む。それらの2断片をアガロースゲル上でサイズ分離し、pUC18中に直接クローニングする。クローン化された挿入断片を、定常領域配列を含む重鎖および軽鎖発現カセット中にそれぞれサブクローニングする。

プラスミドクローン pγe1（実施例14）を重鎖発現カセットとして使用し、再配列されたVDJ配列を Xho I 部位中にクローニングする。プラスミドクローン pCK1 を軽鎖発現カセットとして使用し、

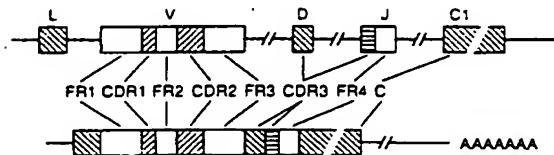


FIG. 1

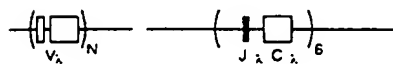


FIG. 2

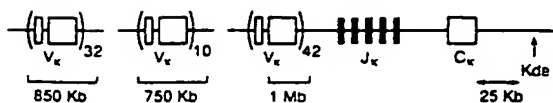


FIG. 3

再配列されたVJ配列を Xho I 部位中にクローニングする。生じたクローンを一斉に使用してSP。細胞をトランスフェクトせしめ、着目の抗原と反応する抗体を産生せしめる（M.S. Co. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2869）。

あるいは、上述のクローン化ハイブリドーマ細胞からmRNAを単離し、cDNAを合成するのに使う。発現されるヒト重鎖および軽鎖VDJおよびVJ配列を、次いでPCRにより増幅し、クローニングする（J. W. Larrich (1989) *Biol. Technology*, 7:934-938）。それらのクローンのヌクレオチド配列を決定した後、同じポリペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを合成し、そしてC. Queen (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5454-5458により記載されたようにして合成発現ベクターを製作する。

本発明の好ましい態様の今までの記載は、例示および説明のために与えられる。それらが徹底的であるつもりはなく、また本発明を正確な開示形態に制限するつもりはない。上記教示に照らして多数の改良および変更が可能である。

本明細書中の全ての刊行物および特許出願は、あたかも各々の刊行物または特許出願が明確に且つ個別に参考として本明細書中に組み込まれると指摘されたかのように、参考として本明細書中に組み込まれる。

当業者により明らかであろうそのような改良および変更は本発明の範囲内であるものとする。

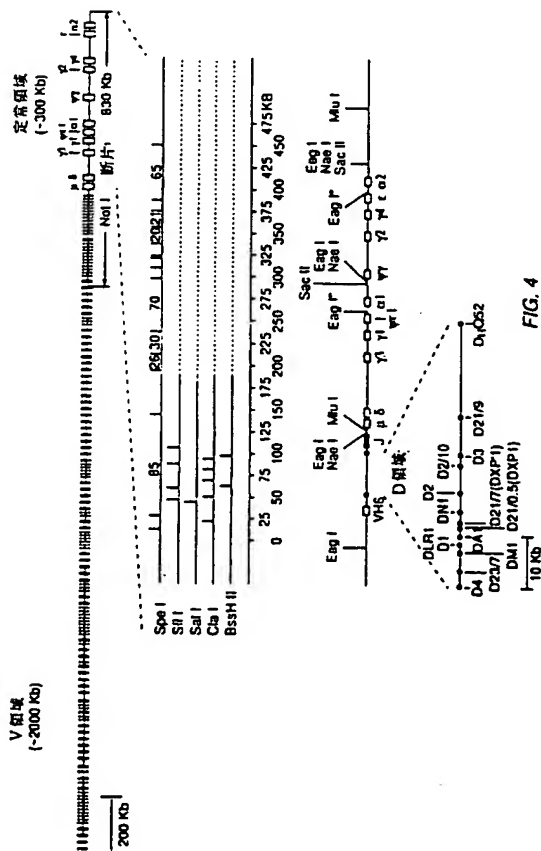
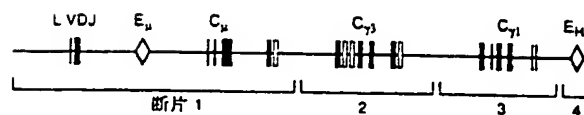
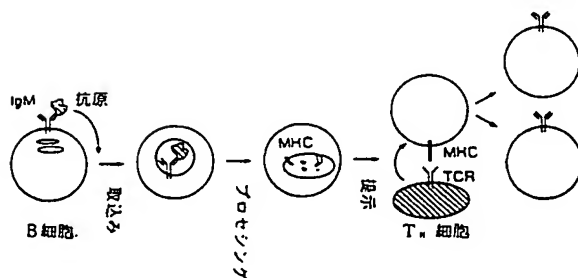
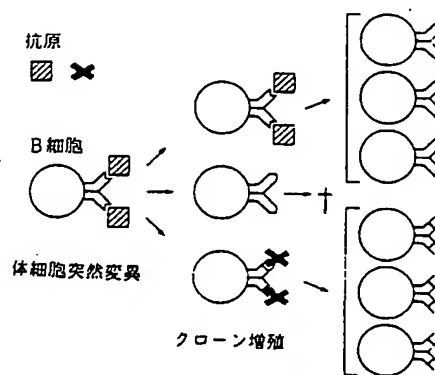
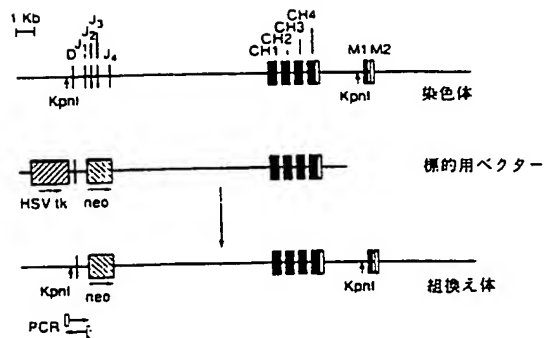
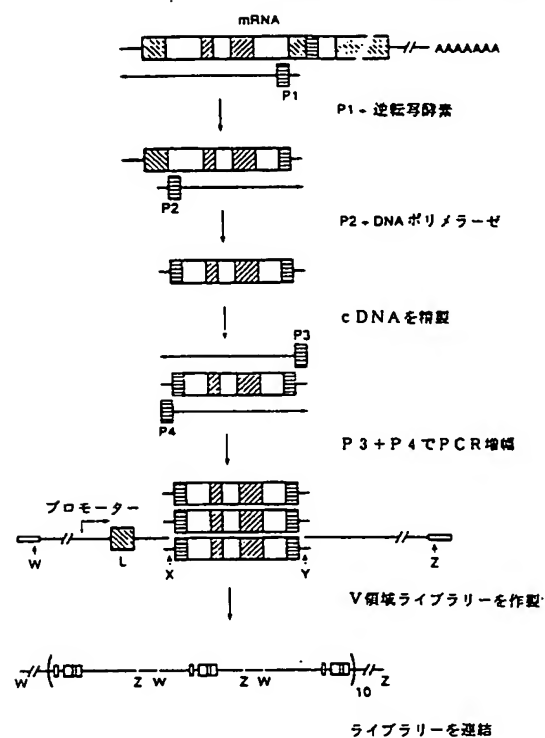
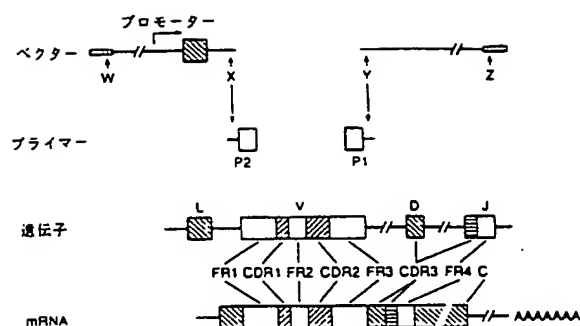


FIG. 4



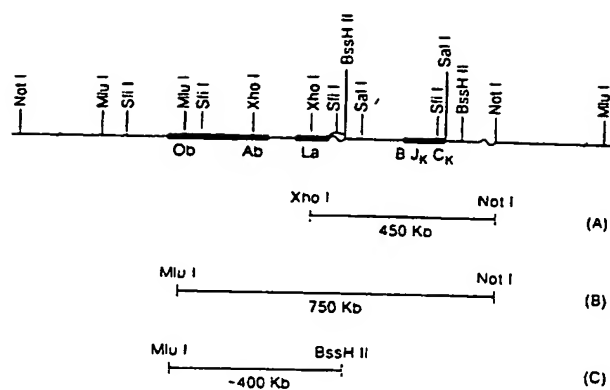


FIG. 11

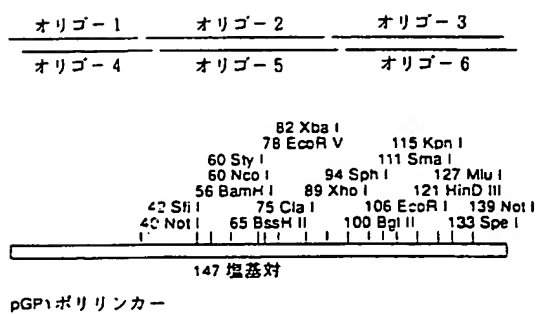


FIG. 13

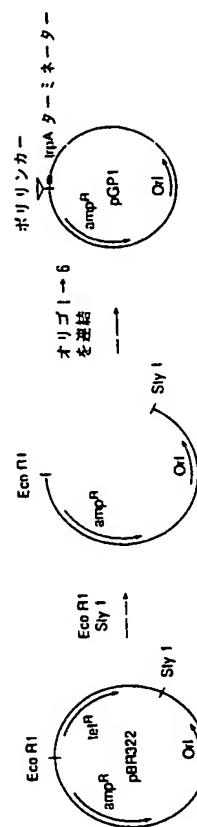


FIG. 12

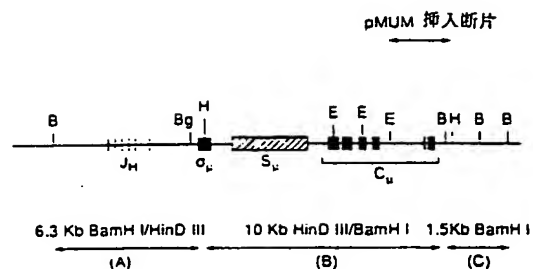
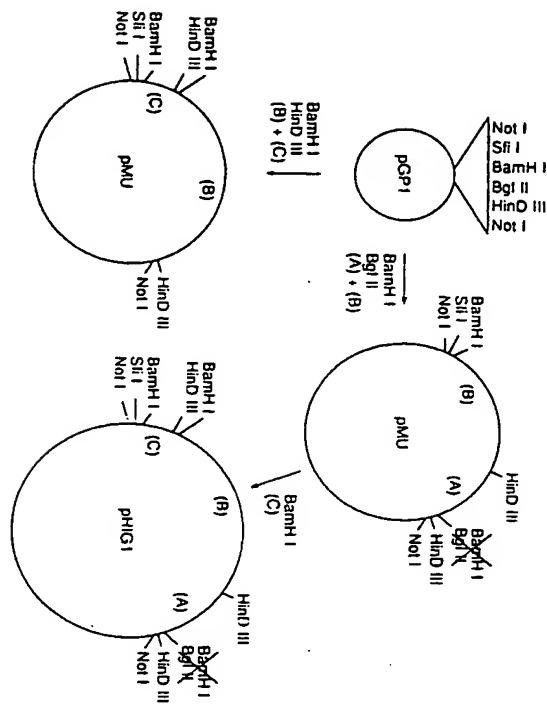


FIG. 14

FIG. 15



ヒト C₁₁ 遺伝子

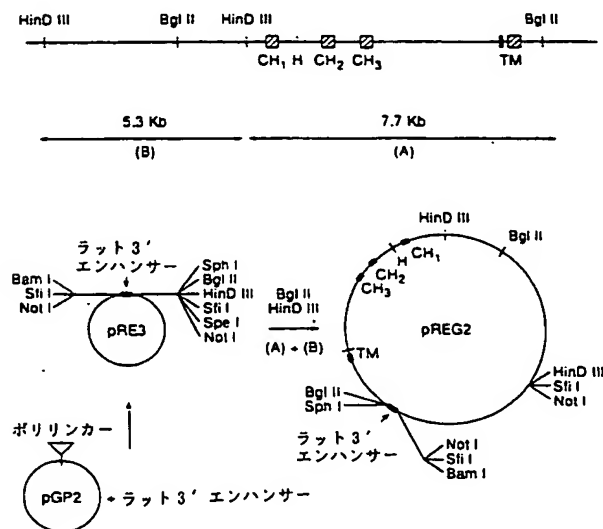


FIG. 16

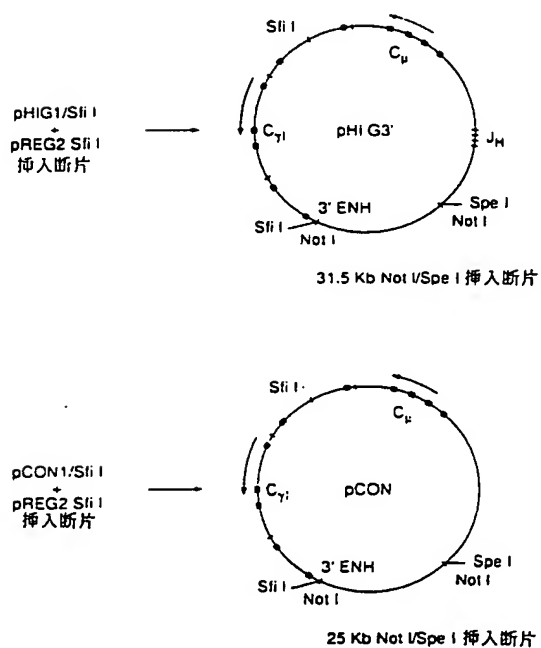


FIG. 17

ヒト D 領域

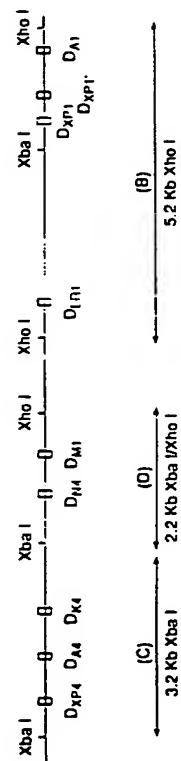


FIG. 18

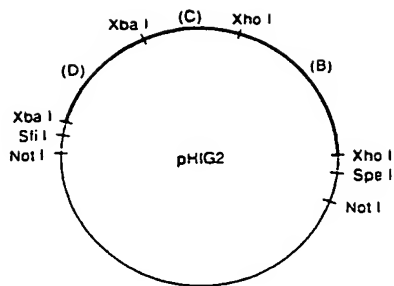


FIG. 19

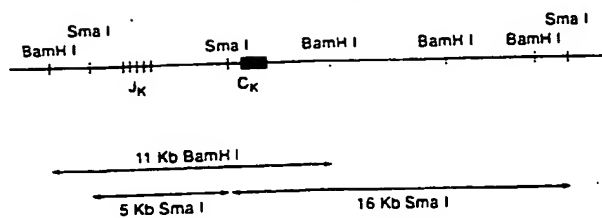


FIG. 20

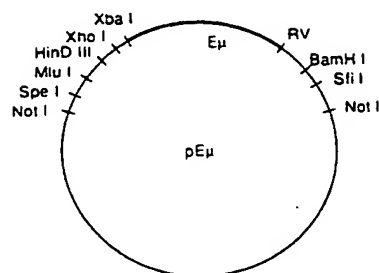


FIG. 21

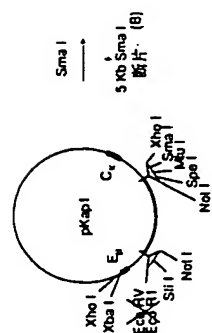
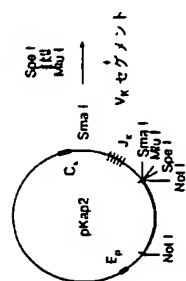
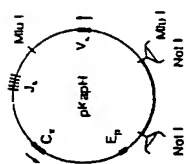


FIG. 22

マウス重鎖遺伝子座

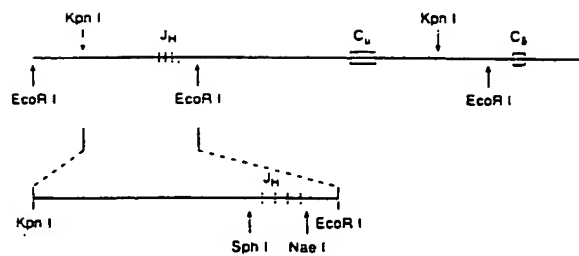


FIG. 23a

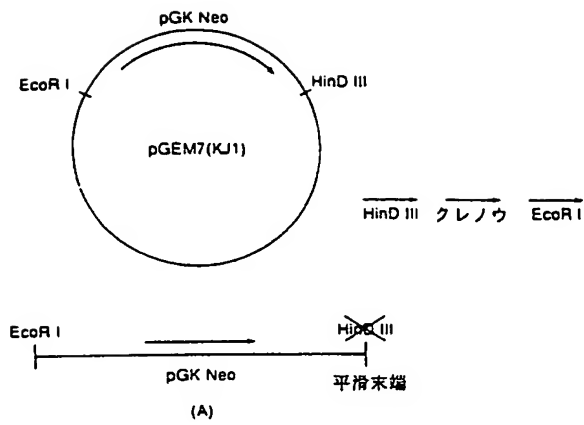


FIG. 23b

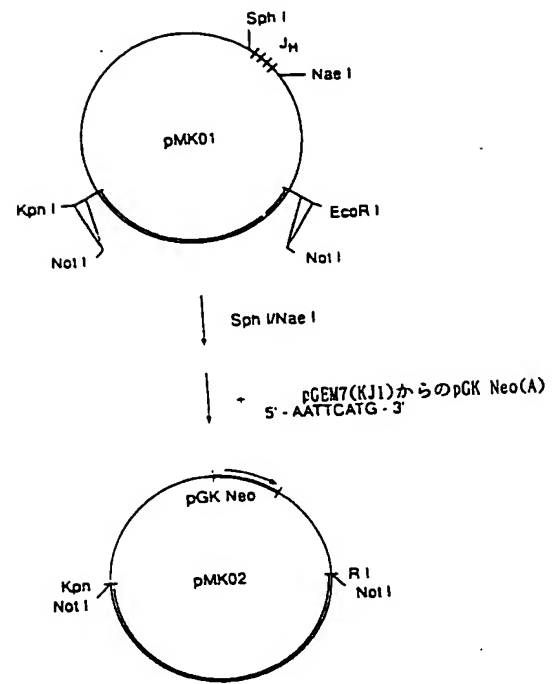


FIG. 23c

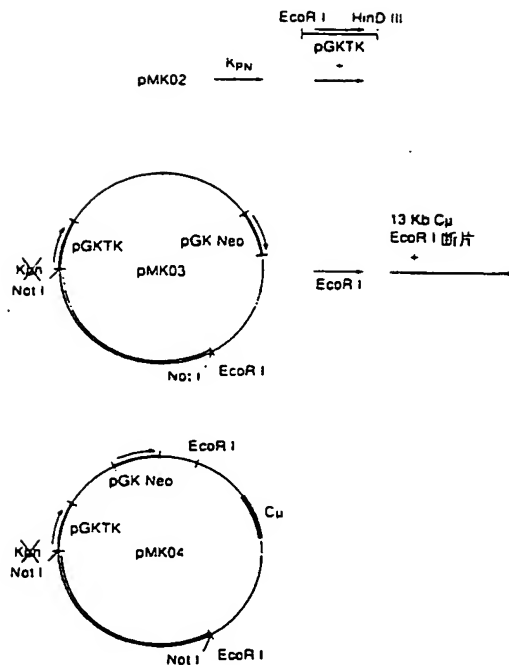


FIG. 23d

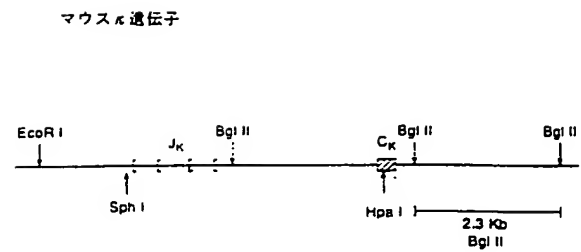


FIG. 24a

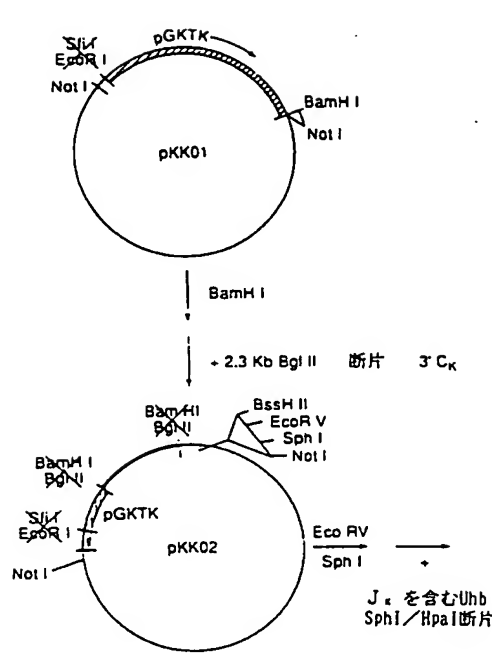


FIG. 24b

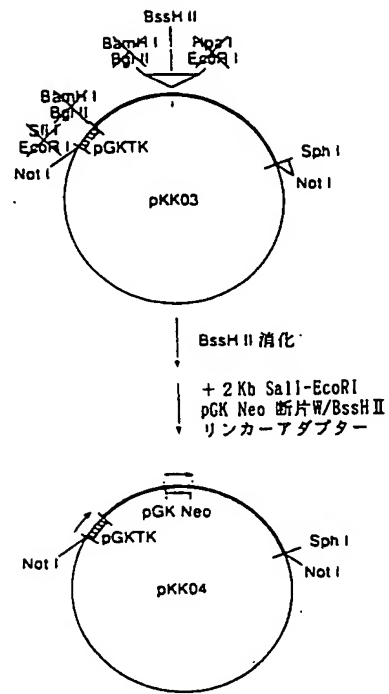


FIG. 24c

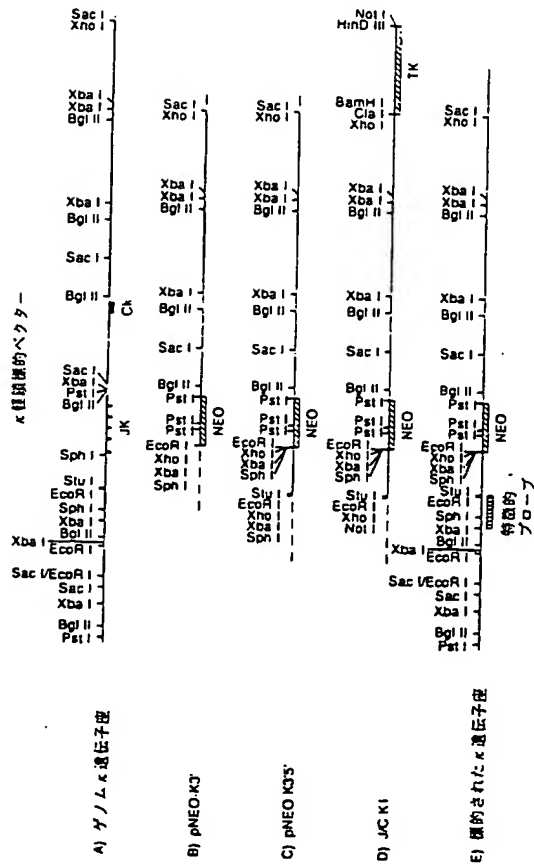


FIG. 25

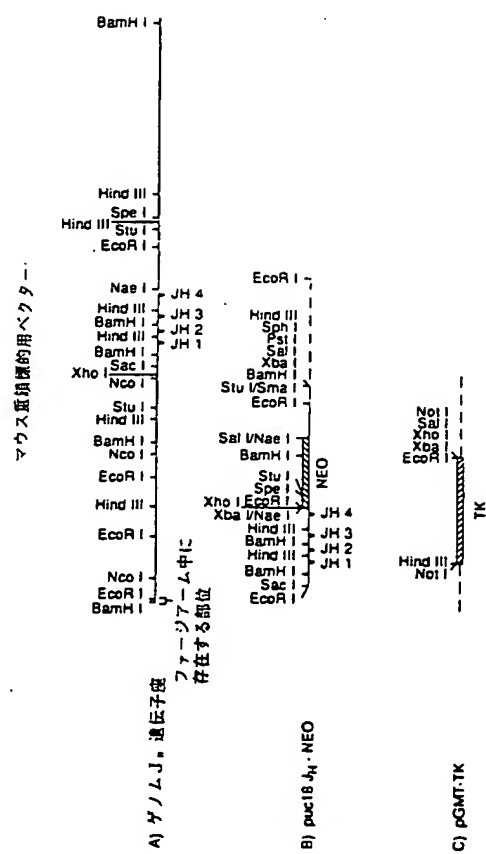
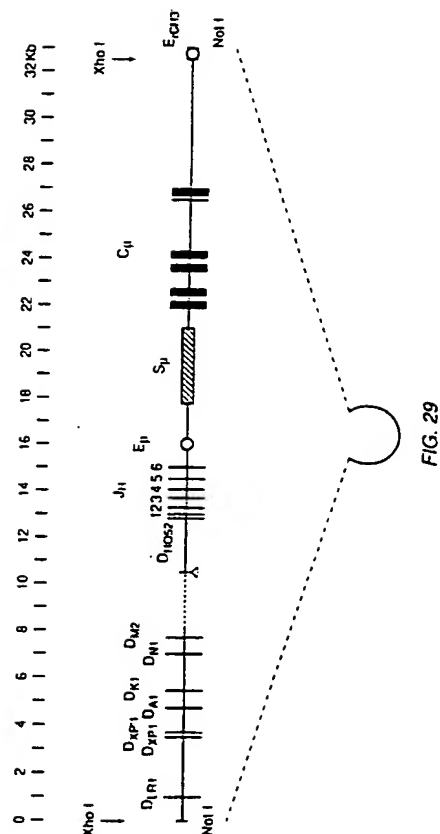
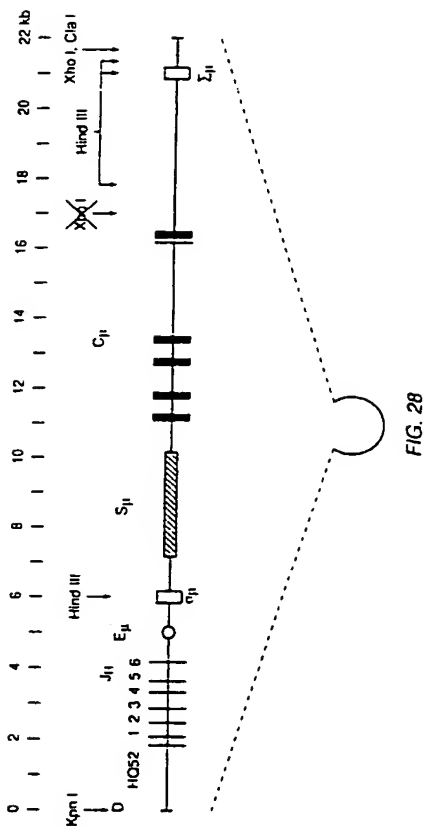
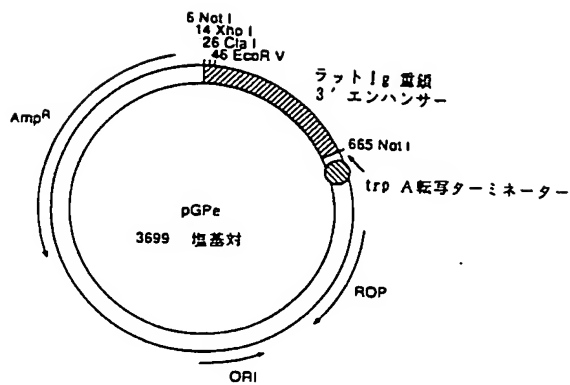
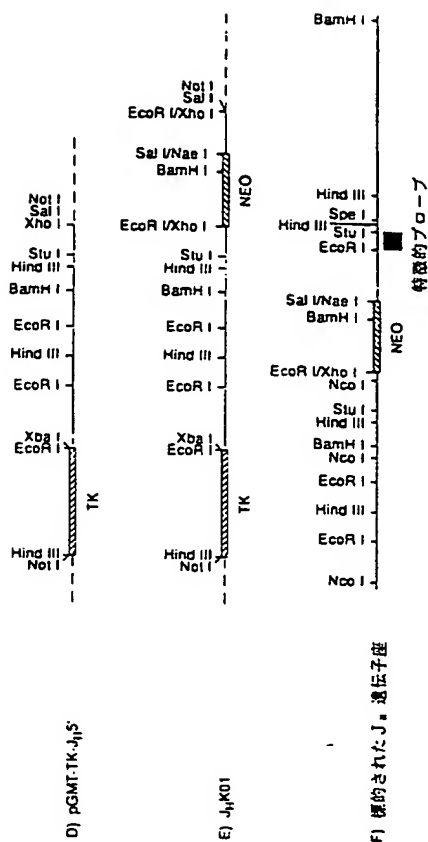


FIG. 26a

マウス胚移植用のベクター



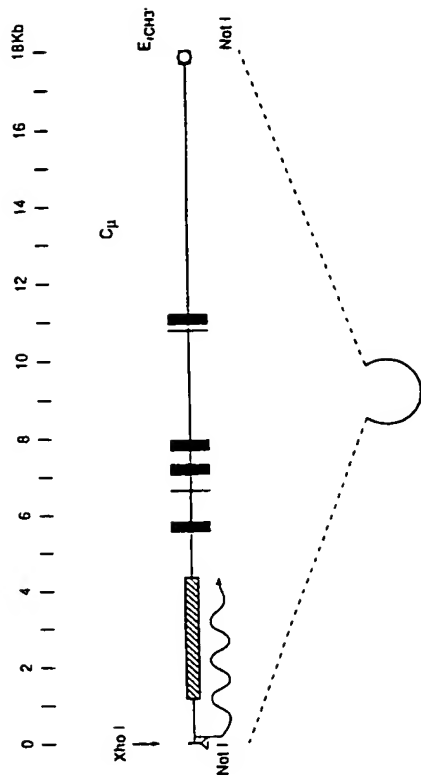


FIG. 31

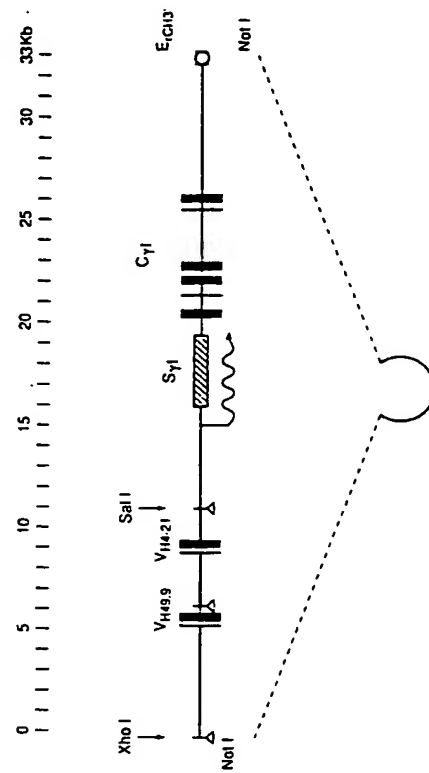
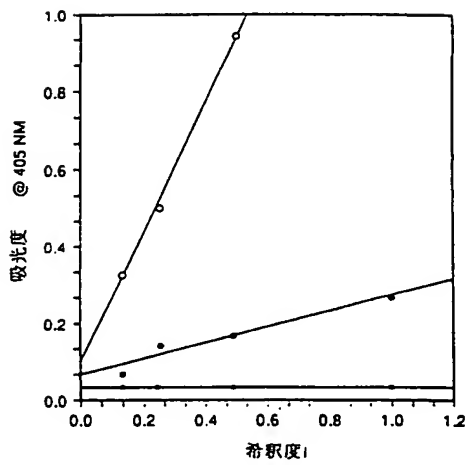


FIG. 32



○ IgM } pHC1 トランスジェニック
● IgG1 }
○ IgM } 非トランスジェニック対照
● IgG1 }

FIG. 33

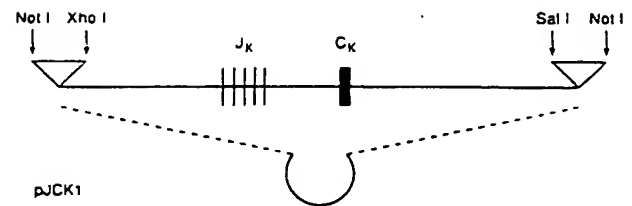


FIG. 34

[illegible]

PCT/L'S91/06185

IN DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUOUS FROM THE SECOND SHEET)			1. Summary for Entry No.
Category	Location of Document	with indication where appropriate of the relevant passage	
Y		Nature, volume 342, issued 23 November 1969, "Gene line transversion of a disrupted β_2 microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells", pages 423-428, see entire document, 71jbtta et al.	28.29.30, 31
Y		Nucleic Acid Research, volume 13, number 23, issue 1967, Lorenz <u>et al.</u> , "Physical map of the human immunoglobulin λ locus and its implication for mechanisms of Vg-Jg rearrangement", pages 9667-9676, see entire document.	10-15.25 27.29.30, 32 34.35.108 111-115
Y		Proceedings National Academy Sciences, volume 86, issued September 1969, Bruggemann <u>et al.</u> , "A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice", page 6789-6713, see entire document.	1.2.4.6.7.8 9.25-27.32 34.35.75.76 78.79.81-84 86.107.109 110.114.116 117.119.127 128.129.130 131-138.146
Y		Nature, volume 314 issued 28 March 1985, Ruvatski <u>et al.</u> , "Translocation and Expression of a specific pair of rearranged immunoglobulin μ and δ genes in a transgenic mouse line", pages 338-324, see entire document.	1-4.6-8. 10-14.25-27 33.35.75.76 79.107-115 116-119.130 137.138

PCT/US91/06185

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
Y	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 80%;"> <p>Proceedings National Academy Science, volume 83, issued April 1986, Tandourdt <u>et al.</u>, "Cell type specific and regulated expression of human γ heavy chain immunoglobulin gene in transgenic mice", pages 2152-2156, see entire document</p> </div> <div style="width: 15%; text-align: right; vertical-align: top;"> 1.3-5.6-8, 25-27 33.75.76.80 81.85.107-110 116-117.119 127-129.137 138.146 </div> </div>
V. <input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNDESIRABLE*	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) in the following category:	
<input type="checkbox"/> Claim numbers:	because they relate to subject matter it was not required to be searched by this international authority;
<input type="checkbox"/> Claim numbers: because they relate to parts of the international application that do not comply with the procedural requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out in, specifically:	
<input type="checkbox"/> Draw numbers: because they are inconsistent claims not drafted in accordance with the existing and then applicable of PCT Rule 13(1)	
VI. <input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING*	
This international Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:	
See Attached	
<input type="checkbox"/> As of referred additional search has been carried out by this authority, this international search report contains all desirable claims of the international application.	
<input type="checkbox"/> As only some of the necessary international search has been carried out by the authority, this international search report contains only those claims of the international application for which there were good, identifiable reasons.	
<input checked="" type="checkbox"/> The referred additional search has been carried out by the authority. Consequently, this international search report is supplemented by:	
1-15, 25-35, 75-86, 107-119, 127-129, 137, 138, 146	
<input type="checkbox"/> As all claims have been searched by the referring national phase authority or the international Searching Authority and already had been duly examined in any applicable law.	
<input type="checkbox"/> The additional search has not been accomplished by a competent authority.	
<input type="checkbox"/> No general observations in the domain of international search laws.	

BEST AVAILABLE COP

Box 4.C. (Cont'd)

The present application is a Continuation-in-Part of US68

575,962 filed 31 August 1990, which is a C-I-P of US68

574,748 filed 29 August 1990.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 5/10			
5/18			
C 1 2 P 21/08		8214 -4B	

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, S E), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, M C, MG, MW, NL, NO, PL, RO, SD, SE, SU, US

(72) 発明者 カイ, ロバート エム.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94111,
 サンフランシスコ, #2301, ジャクソン
 ストリート 155